

UNIVERSITÉ D'AIX-MARSEILLE

FACULTÉ DES SCIENCES DE MARSEILLE

N° D'ORDRE : 42

THÈSES

PRÉSENTÉES

à la Faculté des Sciences de Marseille

POUR L'OBTENTION DU

GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Mireille ROVERY

1^{re} Thèse : Nouveaux aspects de l'acylation des protéines par le cétène et l'isocyanate de phényle.

2^{me} Thèse : Rayons X et structure des protéines.

Soutenues le mercredi 7 avril 1948, devant la Commission d'examen.

MM. A. TIAN, *Président.*

J. ROCHE,	} <i>Examineurs.</i>
P. ROUARD,	
P. DESNUELLE,	

LONS-LE-SAUNIER

IMPRIMERIE MAURICE DECLUME

1 9 4 9

FACULTÉ DES SCIENCES DE MARSEILLE

Nom du Candidat : **ROVERY**

Prénom : **Mireille**

Date de la soutenance : **7 Avril 1948**

Numéro d'ordre : **42**

ROVERY (Mireille).

Nouveaux aspects de l'acylation des protéines par le cétène et l'isocyanate de phényle. — *Lons - le - Saunier, imp. M. Declume, 1949. In-8°, 72 p., 3 fig.*

(Thèse de sciences, Marseille, 1948, n° 42).

ROVERY (Mireille).

Nouveaux aspects de l'acylation des protéines par le cétène et l'isocyanate de phényle. — *Lons - le - Saunier, imp. M. Declume, 1949. In-8°, 72 p., 3 fig.*

(Thèse de sciences, Marseille, 1948, n° 42).

ROVERY (Mireille).

Nouveaux aspects de l'acylation des protéines par le cétène et l'isocyanate de phényle. — *Lons - le - Saunier, imp. M. Declume, 1949. In-8°, 72 p., 3 fig.*

(Thèse de sciences, Marseille, 1948, n° 42).

ROVERY (Mireille).

Nouveaux aspects de l'acylation des protéines par le cétène et l'isocyanate de phényle. — *Lons - le - Saunier, imp. M. Declume, 1949. In-8°, 72 p., 3 fig.*

(Thèse de sciences, Marseille, 1948, n° 42).

UNIVERSITÉ D'AIX-MARSEILLE

FACULTÉ DES SCIENCES DE MARSEILLE

N° D'ORDRE :

THÈSES

PRÉSENTÉES

à la Faculté des Sciences de Marseille

POUR L'OBTENTION DU

GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Mireille ROVERY

1^{re} Thèse : **Nouveaux aspects de l'acylation des protéines par le cétène et l'isocyanate de phényle**

2^{me} Thèse : **Rayons X et structure des protéines**

Soutenues le mercredi 7 avril 1948, devant la Commission d'examen.

MM. A. TIAN, *Président.*

J. ROCHE,

P. ROUARD,

P. DESNUELLE,

} *Examineurs.*

LONS-LE-SAUNIER

IMPRIMERIE MAURICE DECLUME

1 9 4 9



UNIVERSITÉ D'AIX-MARSEILLE

FACULTÉ DES SCIENCES DE MARSEILLE

Mort au Champ d'Honneur :

M. Fr. MARTY,
Maître de Conférences de Mathématiques
(14 juin 1940)

Doyen et Professeur honoraire :

M. A. MARCHAUD

Professeurs honoraires :

MM. CAULLERY, PERES, PETIT, SEVE, KOLLMANN, BOSLER

Doyen : M. P. CHOUX

Assesseur : M. P. ROUARD

Secrétaire : M. H. LANFRANCHI

Professeurs :

A. TIAN	Chimie générale
E. TRAYNARD	Calcul différentiel et intégral
L. MARGAILLAN	Chimie industrielle.
G. CORROY	Géologie et Minéralogie.
P. CHOUX	Botanique générale
R. THIRY	Mécanique rationnelle
R. CERIGHELLI.....	Astronomie
P. ROUARD.....	Physique générale
J. VALENSI.....	Mécanique des fluides
P. DESNUELLE	Chimie biologique
M. ABELOOS.....	Zoologie générale
R. MERIGOUX.....	Physique industrielle

Professeurs sans Chaire :

C. JAUSSEMAN	Physique P. C. B.
A. FAVRE	Météorologie et mécanique de l'atmosphère

Chargés de Cours :

P. BENOIT.....	Physiologie
E. CALVET	Chimie P. C. B.
C. FEHRENBACH.....	Astronomie

Maîtres de Conférences :

J. M. PERES.....	Biologie animale.
R. MOLINIER.....	Biologie végétale.
M. EGER.....	Mathématiques,

Maître de Conférences-adjoint :

J. TIMON-DAVID	Zoologie agricole
---------------------	-------------------

Chargés de Conférences :

J. ROUCH.....	Océanographie
M ^{me} S. TAXY.....	Géographie physique
G. MALCUIT	Botanique appliquée
B. GOUZON.....	Physiologie
C. GOUVERNET.....	Géologie

Maîtres de Conférences honoraires :

MM. E. MEISSONIER, H. BIMAR, D. RICARD, R. PADOVA



Digitized by the Internet Archive
in 2026

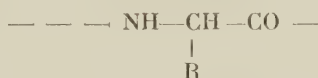
https://archive.org/details/IA41549024_0081

A MES PARENTS

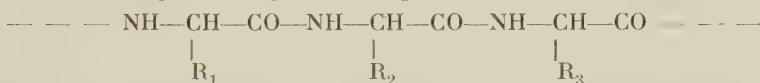
A Monsieur le Professeur P. DESNUELLE

INTRODUCTION.

Les protéines sont de gros édifices moléculaires possédant les caractères des colloïdes lyophiles et renfermant un nombre souvent considérable de restes d'acides α -aminés



Réunis par l'intermédiaire de liaisons peptidiques stables, ces restes se trouvent rangés le long d'une ou plusieurs chaînes polypeptidiques



qui constituent le squelette fondamental des molécules protéiques.

On sait, d'autre part, que les amino-acides naturels, entrant au nombre d'environ 22 dans la composition des protéines, s'ils présentent certaines caractéristiques communes n'en possèdent pas moins des structures chimiques extrêmement variées. C'est qu'en effet, les radicaux désignés précédemment par R_1 , R_2 , etc... peuvent être soit de simples chaînes hydrocarbonées (glycocolle, alanine, valine et leucines), soit des noyaux ou cycles plus ou moins complexes (benzène dans la phénylalanine, imidazol dans l'histidine, indol dans le tryptophane), soit, enfin, contenir des groupements d'atomes formant des fonctions chimiques déterminées (fonction alcool dans la sérine et la thréonine, fonction phénol dans la tyrosine, fonction amine dans la lysine, fonction guanidine dans l'arginine, fonction thiol dans la cystéine, fonction carboxyle dans les acides aspartique et glutamique) ou donnant naissance à des liaisons de type particulier (liaison disulfure de la cystéine et thioéther de la méthionine).

L'hypothèse de la structure purement polypeptidique des protéines ne prévoit pas que ces radicaux participent à des combinaisons quelconques. On les a donc considérés longtemps comme « libres » en les opposant aux fonctions amines et carboxyles en α qui sont impliquées dans les liaisons peptidiques. On pourrait alors s'attendre à ce que ces radicaux, quand ils se trouvent au sein des protéines, se comportent vis-à-vis des réactifs de la chimie organique comme ils le font quand ils appartiennent à des molécules simples. Les peptides synthétiques, renfermant des amino-acides polyfonctionnels, sont en effet bien souvent au moins aussi « réactifs » que les amino-acides eux-mêmes. En d'autres termes, une protéine devrait manifester les propriétés des thiols grâce à ses restes cystéine, les propriétés des phénols grâce à ses restes tyrosine, etc...

En réalité, on observe souvent, d'une part, que certains de ces groupements possèdent dans les protéines une « réactivité » assez faible ou même nulle et, d'autre part, que cette « réactivité » augmente de manière brusque au moment de la dénaturation. Nous verrons dans ce qui va suivre les nombreuses hypothèses émises à propos de ces faits. Quoi qu'il en soit, l'étude de la « réactivité » des groupements protéiques, dans des conditions expérimentales diverses et vis-à-vis de substances chimiques aussi nombreuses que possible, présente un grand intérêt en ce qui concerne la structure même des molécules protéiques.

Mais cet intérêt ne se limite pas là. Certaines protéines pures, en effet, manifestent une grande activité physiologique (enzymatique, virulente, hormonale, etc...). Fait curieux, la composition en amino-acides de ces protéines actives ne diffère pas sensiblement de la composition d'autres protéines cellulaires, parfaitement inactives celles-là. On est alors tenté de rechercher l'origine de l'activité, soit dans la disposition spatiale de certains amino-acides, soit dans un plus ou moins grand degré de liberté de leurs groupements R. Une première approche expérimentale à ce dernier problème est de bloquer, grâce à un réactif approprié, tel ou tel groupement. On observe alors les conséquences de ce blocage sur l'activité de la protéine. En réalité, cette manière de faire, si elle est séduisante dans son principe, se heurte à de graves difficultés sur le plan pratique car chaque molécule contient, nous venons de le voir, de nombreux groupements chimiques différents et il est malaisé de trouver un réactif qui agisse sélectivement, même dans des conditions expérimentales bien choisies, sur tel type de groupements à l'exclusion de tout autre. Il en résulte que, avant de proposer une interprétation physiologique quelconque de ces expériences, il convient de dresser un bilan complet de l'action du réactif étudié sur l'ensemble de la molécule protéique. De plus, ce bilan devra être fait dans des conditions expérimentales variées. En d'autres termes, il faudra étudier la « réactivité » des groupements protéiques vis-à-vis de la substance.

Notons ici que, au sein des organismes vivants, les protéines sont construites selon un plan architectural précis qui confère à ces molécules une partie de leurs caractéristiques physiques et chimiques ainsi que, le cas échéant, leur activité physiologique. C'est ce que l'on appelle la forme native des protéines. Mais, pour beaucoup d'entre elles, cette forme est très instable et, sous l'influence de certains réactifs ou dans certaines conditions, la structure protéique subit des remaniements profonds dont l'ensemble est appelé processus de dénaturation. Ce processus est fort complexe et nous n'entreprendrons pas ici sa discussion détaillée. Mais ce que l'on sait de manière certaine, c'est qu'il provoque, d'une part, un bouleversement complet des caractéristiques physiques et chimiques de la protéine et, d'autre part, l'abolition fréquente de l'activité physiologique, quand la forme native en est douée.

Quand il s'agit d'étudier le comportement d'une substance quelconque vis-à-vis des protéines, on comprend donc qu'il faille considérer deux cas bien distincts :

1°) On a entrepris cette étude pour tâcher d'élucider certains points

de la structure protéique. Il conviendra alors d'étudier de façon comparative, sur la protéine native et dénaturée, la « réactivité » des groupes protéiques à l'égard de la substance. On constatera alors des différences très notables qui aideront à comprendre ce qui se passe en cours de la dénaturation.

2°) On a entrepris cette étude pour tâcher de connaître le rôle que joue, dans l'activité physiologique d'une protéine, tel de ses groupements R. Il faudra alors se garder de choisir un réactif ou des conditions expérimentales entraînant la dénaturation.

Ce rapide aperçu nous montre que l'étude de la « réactivité » des groupes protéiques présente un intérêt considérable dans l'élucidation de la structure et de l'activité des protéines. Un dernier point reste à évoquer : son importance sur le plan pratique. Les groupements R règlent en effet, dans une large mesure, la solubilité des protéines à divers pH, leur aptitude au gonflement (et toute autre propriété dépendant de leur caractère lyophile), leur passage de la forme globulaire à la forme fibreuse, leur pouvoir absorbant de produits tinctoriaux, etc... Les protéines, telles qu'elles nous sont fournies par la nature, ne présentent pas toujours des propriétés absolument favorables à ces divers points de vue et on cherche à les modifier en agissant sur leurs groupements R. Il est alors bon de savoir comment agir avec le maximum de succès.

L'ensemble de ces considérations explique pourquoi, depuis longtemps, les chimistes puis les biochimistes se sont préoccupés de savoir comment les réactifs classiques de la chimie organique agissent sur les protéines. De très nombreux travaux faisant appel aux réactifs les plus divers ont déjà été publiés à cet égard. C'est ainsi que Herriott, dans son excellente monographie (1), a pu rassembler 396 références quoiqu'il se soit limité aux travaux récents et aux réactions sur les protéines natives. Nous n'entreprendrons donc pas, dans ce qui va suivre, une bibliographie complète de la question et nous ne citerons que les références qui ont influencé directement la marche de notre travail.

La structure des protéines est assez diverse pour qu'on puisse impliquer ces substances dans presque toutes les réactions de la chimie organique. Il est évident toutefois qu'une sérieuse discrimination doit être faite et on choisira les réactions susceptibles a priori de livrer des renseignements intéressants. Parmi ces dernières, les réactions d'acylation (fixation sur les molécules protéiques des radicaux $R-CO-$) ont spécialement retenu notre attention. Nous en dirons les raisons plus tard. Mais notons, dès maintenant, que de nombreux travaux ont déjà été publiés à leur sujet, spécialement quand le réactif acylant mis en œuvre est le cétène et l'isocyanate de phényle. A première vue, tout semble avoir déjà été dit sur ce sujet. Cependant, en 1938, Neuberger (2) remarquait que si l'on connaissait bien l'action du cétène sur l'histidine et ses dérivés ainsi que sur la cystéine, une grande incertitude régnait par contre en ce qui concerne l'action de ce réactif sur les noyaux imidazol et les groupements thiol protéiques. Partant de cette observation, nous avons tout d'abord cherché, dans les chapitres III et IV de notre thèse, à élucider ces deux points. Pendant que le travail était en cours, un article de Fraenkel-Conrat (3)

concernant l'acylation des groupes thiol de l'albumine d'œuf, est venu à notre connaissance. Nous ne partageons pas toujours l'opinion de l'auteur américain. Nous en discuterons plus tard.

L'un des points les plus intéressants mis en lumière au cours de cette étude, est que la vitesse d'acylation des groupements thiol protéiques varie considérablement en fonction de l'état de « réactivité » de ces groupements. C'est ainsi par exemple que, à pH = 4 environ, le cétène acétyle presque instantanément les SH « réactifs » de la kératine ou de l'albumine d'œuf en solution dans le dodécylsulfate de Na, tandis qu'il n'attaque pas ou très peu les SH « non-réactifs » de l'albumine native.

Or il existe certaines protéines physiologiquement actives comme l'uréase en particulier, qui possèdent plusieurs SH doués de « réactivités » différentes. Cette uréase est comptée depuis longtemps dans la classe des « sulfhydryl enzymes », c'est-à-dire des ferments dont l'activité est conditionnée par la présence de groupes de SH libres. Mais, depuis les expériences plus récentes d'Hellerman (4), il semble que les groupes SH essentiels ne soient pas les plus « réactifs » mais bien ceux dont la « réactivité » est immédiatement inférieure. La cétène et l'isocyanate de phényle, discriminant de façon extrêmement nette entre les divers SH selon leur « réactivité », il nous a semblé opportun de chercher à confirmer les vues d'Hellerman par leur intermédiaire. Les expériences effectuées dans ce domaine seront décrites au chapitre IV de la présente thèse.

Enfin, certains indices recueillis dans la littérature scientifique récente semblent montrer que les groupes OH phénoliques voient, à l'instar des groupements thiol, leur « réactivité » générale augmenter au moment de la dénaturation de certaines protéines (5). Il est alors intéressant de comparer, au sein des protéines natives et dénaturées, leur aptitude à l'acylation. Notre chapitre V y est consacré.

Notre travail se subdivisera donc ainsi :

Introduction.

Chapitre I. Exposé bibliographique et but du travail.

Chapitre II. Techniques de préparation et de dosage.

Chapitre III. Action du cétène sur les noyaux imidazol de l'histidine et des protéines.

Chapitre IV. Acylation des groupes thiol protéiques. Son application à l'étude de l'uréase.

Chapitre V. Sur l'acétylation des groupes phénol protéiques.

Conclusions générales, résumé et bibliographie.

CHAPITRE I.

EXPOSÉ BIBLIOGRAPHIQUE.

PARAGRAPHE I.

Acylation des protéines.

A. — ACYLATION DES GROUPES NH_2 ET OH PHÉNOLIQUES.

Les molécules protéiques contiennent de nombreux groupements susceptibles d'être acylés : ce sont en particulier les NH_2 et NH , les OH phénoliques, les OH alcooliques et les SH. On a tout d'abord cherché à réaliser ces acylations en suivant simplement la technique classique de Schotten-Baumann. Le choix des chlorures d'acide susceptibles d'être mis en œuvre est alors grand mais de multiples circonstances viennent compliquer l'interprétation des résultats. Le premier travail vraiment constructif dans ce domaine (*) est celui d'Herriott et de Northrop (5, 6) sur l'acétylation de la pepsine par le cétène. Ce dernier réactif, $\text{CH}_2 = \text{C} = \text{O}$, est un gaz que l'on obtient aisément par pyrolyse des vapeurs d'acétone (voir chapitre « Techniques »). Il présente une grande affinité pour l'eau au sein de laquelle il se transforme d'abord en anhydride puis en acide acétique (7). Malgré ce fait, il peut réaliser des acétylations en milieu aqueux et dans des conditions de pH tout à fait variées. Au cours de leur très belle étude, les auteurs américains, se tenant à pH = 5,5, préparent à l'état cristallisé 3 pepsines acétylées successives :

a) une pepsine « 100 p. 100 active » ne contenant presque plus de NH_2 libres (4 NH_2 disparus par mol.) et 4 groupes acétyle.

b) une pepsine « 60 p. 100 active » contenant 6-11 groupes acétyle dont 4 sont accrochés aux NH_2 et 3 aux OH phénoliques. Cette préparation, maintenue dans SO_4H_2 dilué, redonne la pepsine « 100 p. 100 active » par perte de 3 groupes acétyle et réapparition de 3 OH phénoliques.

c) une pepsine « 10 p. 100 active » contenant 20-30 radicaux acétyle dont 4 se trouvent sur les NH_2 et 8 sur les OH phénoliques.

La teneur de ces diverses protéines en NH_2 et OH phénoliques est trouvée respectivement par la méthode Van Slyke et la méthode Herriott à pH₈ et pH₁₁ (voir chapitre « Techniques »).

(*) Nous nous limiterons ici aux acylations effectuées en milieu aqueux.

L'acétylation semble donc porter, dans les conditions utilisées, d'abord sur les groupes aminés puis sur les groupes OH phénoliques. Toutefois, des bilans très soigneux faits sur les acétyles montrent que d'autres groupes protéiques sont également touchés quand l'acétylation se prolonge. Malgré ce fait, les auteurs américains concluent de leurs essais que l'activité de la pepsine ne dépend pas de ses NH_2 libres mais, par contre, se trouve fort probablement en relation étroite avec la présence d'OH phénoliques libres dans la molécule fermentaire. Cette dernière conclusion est d'ailleurs rendue assez aléatoire par les bilans d'acétyles publiés par les auteurs eux-mêmes. Quand l'acétylation se prolonge, c'est-à-dire justement au moment où l'inactivation intervient, des acétyles se sont certainement fixés ailleurs que sur les NH_2 et les phénols.

Les résultats précédents ouvrent évidemment de riches perspectives, d'autant plus que le cétène agit à froid et dans des conditions de pH qui ne dénaturent pas la plupart des protéines. De nombreux travaux analogues ont donc été effectués. Il serait fastidieux et bien inutile de les rappeler tous ici (voir à cet égard la monographie d'Herriott (1)). Signalons simplement qu'ils diffèrent entre eux par la protéine mise en jeu, par les conditions de pH et de température, enfin, par la nature du réactif acylant.

Notons qu'en ce qui concerne le pH, Northrop et Herriott ont travaillé en milieu légèrement acide car leur pepsine est rapidement dénaturée dès que le pH dépasse 6. Il est alors assez curieux de constater que leurs imitateurs, quoiqu'ils étudient des protéines parfaitement stables à réaction neutre ou faiblement alcaline, ont presque tous utilisé le $\text{pH} = 5,5$. Il est bien connu pourtant que le cétène est un agent d'acétylation beaucoup plus actif en réaction légèrement alcaline. Seuls Miller et Stanley (8) semblent jusqu'ici s'être risqués à utiliser le $\text{pH} = 8,1$ dans leur acétylation du virus de la mosaïque du tabac. Ils observent alors évidemment des transformations plus rapides et plus profondes. Afin d'assurer un pH à peu près constant pendant l'acétylation, on se sert de tampons très concentrés (jusqu'à 3 M), de la dialyse contre un volume important de tampon, ou bien on a recours à des additions ménagées de soude.

Il est certes fort difficile de dégager, sur le plan chimique, une impression d'ensemble de tous ces travaux car, en réalité, il n'existe pas une chimie des protéines. Chaque protéine réagit en effet d'une manière qui lui est propre car elle découle directement de sa structure, de son poids moléculaire, de sa stabilité, etc... L'expérience que l'on peut acquérir avec l'une n'est pas applicable à l'autre sans discussion préalable. Tirer des conclusions d'une série d'observations éparses est donc, dans ces conditions, une tâche délicate que nous n'entreprendrons pas. D'autre part, les imitateurs de Northrop et Herriott, soit qu'ils ne possèdent pas l'habileté expérimentale de ces auteurs, soit que le problème se présente pour eux de façon plus ardue, ne semblent pas s'être entourés d'autant de garanties que leurs modèles. En particulier, ils n'isolent plus à l'état pur les protéines acétylées mais se contentent soit de dialyser afin d'éliminer les impuretés (tampon et acide acétique provenant du cétène) soit d'obtenir des poudres amorphes par précipitation.

De plus, on ne s'inquiète plus comme Northrop et Herriott, sauf

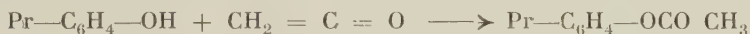
dans quelques cas bien particuliers (8), de comparer le nombre de groupes protéiques bloqués au nombre d'acétyles fixés. Schramm et Muller (9) cependant essaient de doser les acétyles sur leurs préparations de virus acétylés, sans d'ailleurs le moindre succès.

Malgré toutes ces incertitudes, un fait demeure : ce sont les groupes NH_2 protéiques qui supportent la majeure part de l'action du cétène selon la réaction :



Mais, d'après certains auteurs et pour certaines protéines (5, 6, 9, 18), l'acétylation des NH_2 est rapide et totale tandis que pour d'autres (8, 10), elle débute d'abord rapidement puis ralentit bientôt et tend vers une limite de 70-80 p. 100. On peut évidemment penser que certaines protéines possèdent des NH_2 difficilement accessibles mais n'oublions pas que des résultats contradictoires ont été obtenus, selon les auteurs, sur une seule et même protéine. Ce fait s'explique d'ailleurs aisément car, avant toute acétylation déjà, la teneur des protéines en NH_2 libres est faible et la méthode de Van Slyke est assez incertaine.

Quoi qu'il en soit, à côté de ce phénomène inassif, s'en déroule un autre beaucoup plus lent : l'acétylation des groupes OH phénoliques selon la réaction :



La vitesse de cette réaction est pratiquement nulle au-dessous de $\text{pH} = 4$. Au-dessus de ce pH et à température ordinaire, elle devient notable mais sans jamais atteindre la vitesse d'acétylation des NH_2 . Cette fois, tout le monde semble noter que la réaction ne peut être menée à son terme. Seuls Stern et White (18) arrivent à bloquer presque tous les groupes phénol de l'insuline par une acétylation de 30 h. à $\text{pH} = 5,5$.

A part le cétène, deux autres réactifs acylants des protéines semblent devoir être cités : l'isocyanate de phényle et ses dérivés ainsi que le suboxyde de carbone. Le 1^{er} de ces réactifs répond à la formule $\text{C}_6\text{H}_5-\text{N}=\text{C}=\text{O}$. Il se combine lentement avec l'eau en donnant de la diphenylurée $(\text{C}_6\text{H}_5-\text{NH})_2\text{CO}$ et avec les alcalis pour donner de l'aniline. Son comportement vis-à-vis des NH_2 protéiques semble analogue à celui du cétène mais le pH doit être plus élevé (7 à 8). La réaction, qui forme des dérivés phényl-uréidés de la forme $\text{Pr}-\text{NH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{C}_6\text{H}_5$, semble tantôt complète (11) tantôt incomplète (en particulier avec l'albumine d'œuf (12)). L'introduction d'un halogène dans le noyau (isocyanate de p-bromo phényle) fournit un moyen simple de connaître le nombre de molécules du réactif fixé sur la protéine. On semble alors trouver généralement qu'il est égal au nombre de NH_2 disparus (9, 13) et d'autres expériences viennent confirmer ce point de vue (19, 20, 21). On pourrait alors penser que les isocyanates, contrairement au cétène, n'agissent pas sur les OH phénoliques en milieu aqueux. Notons en particulier que l'isocyanate de phényle ne fait pas baisser le nombre des OH phénoliques de l'albumine d'œuf (3). Mais, par contre, Miller et Stanley (8) trouvent que les OH phénoliques du virus de la mosaïque de tabac réagissent plus vite avec l'isocyanate de phényle qu'avec le cétène. Ces résultats con-

tradictioires peuvent évidemment provenir, comme il sera discuté plus tard, d'une différence dans la « réactivité » des OH phénoliques selon la protéine à laquelle on s'adresse. Mais il ne faut pas oublier aussi que le dosage par la méthode d'Herriott des groupes phénol bloqués est très difficile en présence d'isocyanate pour des raisons que l'on trouvera dans le chapitre « Techniques ».

Nous passerons beaucoup plus rapidement sur le suboxyde de carbone que nous n'avons pas eu l'occasion d'utiliser. Signalons simplement qu'il accroche avec, semble-t-il, la même vitesse, des radicaux malonyl aux groupes NH_2 et phénol de la sérumalbumine (14). Ce fait, s'il était confirmé, distinguerait nettement le nouveau réactif du cétène et des isocyanates.

Incertaines sur le plan chimique, ces expériences sont évidemment assez difficiles à interpréter sur le plan physiologique. On note en général qu'une acylation de courte durée n'a pas d'influence sur l'activité des protéines étudiées. Selon les résultats d'analyse, on en déduit alors que, soit la totalité des NH_2 , soit les NH_2 facilement acylables, ne jouent aucun rôle dans l'activité (voir par contre (19 et 20)). Si l'acylation se prolonge, une inactivation progressive se manifeste tandis que deux transformations chimiques peuvent être décelées : Soit l'acylation des groupes phénol seulement soit l'acylation simultanée des groupes phénols et des groupes aminés difficilement acylables. Dans le 1^{er} cas, on n'hésite pas à attribuer l'inactivation au blocage des OH phénoliques ; dans le 2^e cas, on se montre plus réservé et on se garde de toute conclusion définitive. Quoi qu'il en soit, un fait nous paraît digne de remarque : c'est que l'inactivation est toujours provoquée par un long traitement chimique : 12 — 35 h. pour la pepsine, 17 h. pour l'insuline etc... Il semble alors bien difficile de penser que, pendant un laps de temps aussi considérable, le cétène limite strictement son action à deux types de groupements seulement. Peut-être le réactif provoque-t-il d'autres transformations encore inconnues (masquage ou destruction d'autres groupements — Dénaturation commençante n'entraînant pas encore la perte de la solubilité — Modifications stéréochimiques, etc...).

Un fil conducteur extrêmement précieux devrait d'ailleurs nous être fourni dans ce dernier domaine par la réactivation. Que la protéine rendue inactive par acylation regagne en effet la totalité ou une partie de son activité quand on la place en milieu acide ou alcalin, il y aura de fortes chances pour que l'inactivation résulte, non d'un processus irréversible (dénaturation, ouverture de noyaux, destruction de groupements), mais bien d'un simple blocage de certains groupes par un radical acylé. Bien mieux, l'aise avec laquelle s'effectue cette réactivation devrait nous permettre de décider si elle est due à la rupture de liaisons labiles (O-acyles) ou stables (N-acyles). C'est ainsi par exemple que Herriott (5) repasse à la pepsine « 100 p. 100 active » en maintenant simplement la protéine « 60 p. 100 active » dans SO_4H_2 dilué. Mais la pepsine, de par sa stabilité en milieu acide, représente un cas tout à fait particulier. Bien souvent, les conditions de pH qui provoquent l'hydrolyse des liaisons acyles, même des plus labiles d'entre elles, se trouvent largement en dehors de la zone de stabilité de la protéine. La réactivation est alors impossible (9). D'ailleurs, la pepsine « 10 p. 100 active » d'Herriott ne peut plus être ré-

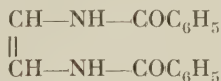
activée et ce fait suggère après tant d'autres qu'une acylation longue provoque chez les protéines des phénomènes complexes encore mal connus.

B. — AUTRES TRANSFORMATIONS.

Si l'acylation des groupes aminés et phénoliques a tout d'abord retenu l'attention des chercheurs, c'est sans doute à cause du travail de Bergmann et Stern (15) concernant l'action du cétène sur les amino-acides. Ce travail ne décrit en effet que les dérivés N— acétylés des amino-acides simples et la O—N diacétyltyrosine. Il convient de se demander cependant si Bergmann et Stern n'ont pas péché par omission et si l'action du cétène ne se porte pas également sur d'autres groupements.

L'excellent travail de Neuberger (2) ouvre à cet égard d'intéressantes perspectives car, s'il montre que les groupes guanidine et alcool restent probablement intacts, il attire par contre l'attention sur le sort des noyaux imidazol et des groupes SH apportés aux protéines, respectivement, par l'histidine et la cystéine. Il suggère d'autre part que le cétène est susceptible de provoquer des isomérisations à l'intérieur même de la molécule protéique.

En ce qui concerne tout d'abord les noyaux imidazol, Neuberger signale que la glyoxaline en solution dans l'éther est transformée par le cétène en un composé non-cristallisable ne donnant plus la réaction de Pauly. Cette destruction de noyaux imidazol doit être rapprochée de celle citée il y a longtemps déjà par Bamberger (16) et Windaus (17). Au cours de cette réaction, connue sous le nom de réaction de Bamberger, le chlorure de benzoyle transforme le noyau imidazol en une α dibenzoyldiamine insaturée :



La scission ne se produit plus d'ailleurs dès que le noyau imidazol porte un groupement carboxyle. Neuberger remarque alors que l'histidine, protégée par son carboxyle, peut n'être pas touchée mais qu'elle est susceptible de l'être quand elle se trouve impliquée dans une chaîne peptidique. Nous verrons dans le chapitre III que les choses se passent en réalité de façon tout-à-fait différente.

Quant aux fonctions thiol de la cystéine et de l'acide β thiolpropionique, le cétène et l'isocyanate de phényle les acylent très vite au-dessus du pH = 5,6 (2). Ce fait donne à penser que, dans les protéines, les SH et les OH phénoliques sont touchés au même titre. Cette possibilité est d'ailleurs envisagée depuis longtemps par de nombreux auteurs mais il faut attendre ces toutes dernières années pour qu'un travail lui soit directement consacré. C'est en effet en 1944 seulement que Fraenkel-Conrat compare l'acylation des SH de l'albumine d'œuf par le cétène, l'isocyanate de phényle et le suboxyde de carbone, avec celle des groupes aminés et phénoliques.

Au cours de ce travail, l'auteur n'étudie que la partie protéique restée soluble pendant le traitement. Il trouve alors que les SH sont acylés très notablement par les trois réactifs mis en œuvre, quoique

de façon lente. La vitesse exacte du phénomène n'est d'ailleurs pas très clairement explicitée. Mais une comparaison semble possible entre l'affinité présentée par les divers réactifs vis-à-vis de l'albumine native : C'est le suboxyde de carbone qui arrive en tête suivi de l'isocyanate de phényle et du cétène. Deux points intéressants sont en outre signalés : d'une part, l'acylation des SH se déroule aussi bien à $\text{pH} = 4$ qu'en milieu neutre. D'autre part, les liaisons thioester formées au cours de l'acylation sont sensibles aux alcalis comme les liaisons ester ordinaires.

L'impression générale qui se dégage de ce travail est donc que l'acylation des SH protéiques est possible mais qu'elle est lente. Notons toutefois que les SH de l'albumine se trouvent sous une forme particulièrement peu « réactive » (voir paragraphe suivant). L'exemple de cette protéine paraît donc assez mal choisi pour juger de l'aptitude des groupes SH à s'acyler. Nous reviendrons sur cette question plus tard.

Quant aux racémisations susceptibles d'être provoquées par le cétène au sein des molécules protéiques, aucune étude n'a encore été faite. De plus, en dehors des possibilités évoquées par Neuberger, d'autres peuvent venir à l'esprit : les noyaux indol protéiques par exemple ne voient-ils pas acyler leur groupe NH ? On sait en effet que le tryptophane est acylé à cet endroit par le cétène en perdant son pouvoir chromogène vis-à-vis du réactif de Folin (6). Le produit obtenu est stable à $\text{pH} = 11$. Si cette réaction a lieu au sein des protéines, leur pouvoir chromogène pH_{11} doit diminuer pendant l'acylation. Tel n'est pas le cas pour le virus de la mosaïque du tabac tout au moins (8).

Signalons enfin pour terminer que les groupes NH_2 des amides pourraient également être acylés. Ce processus a été évoqué par Freudenberg (22) et Jensen (20) dans leur étude de l'inactivation de l'insuline par l'isocyanate de phényle.

PARAGRAPHE II.

« Réactivité » des groupes thiol et phénol des protéines natives et dénaturées.

Chaque association d'atomes à l'intérieur d'une molécule possède un ensemble caractéristique de propriétés chimiques. Toutefois, l'intensité de ces propriétés, c'est-à-dire l'aptitude que présente l'association à réagir avec telle ou telle substance de la chimie organique peut varier considérablement selon la molécule à laquelle appartient cette association. C'est ce que l'on exprime en disant que sa « réactivité » varie. Voici un exemple particulièrement frappant de ce fait : les groupes thiol sont toujours susceptibles de réagir avec les oxydants, mais, tandis qu'une solution de cystéine contenant une trace de métal lourd s'autoxyde très rapidement en cystine, le glutathion réduit ($G-SH$) ne donne du glutathion oxydé ($G-S-S-G$) que sous l'influence de donateurs d'oxygène puissants comme l'eau oxygénée.

Nous avons déjà fait remarquer dans l'introduction que la « réactivité » de certains groupements protéiques est souvent inférieure dans les protéines natives à celle que possèdent ces mêmes groupements dans des amino-acides simples. Deux moyens principaux sont alors à notre disposition pour augmenter la « réactivité » des groupes protéiques : soit, et ceci présente peu d'intérêt, hydrolyser les protéines par voie chimique ou fermentaire, soit traiter ces protéines par des agents extrêmement doux, incapables en apparence de scinder n'importe quelle liaison stable mais provoquant néanmoins des bouleversements parfois profonds. Nous voulons parler des agents dénaturants.

Ce serait sortir de cet exposé que d'entreprendre l'étude détaillée de la dénaturation. Signalons simplement qu'elle est provoquée par les agents physiques et chimiques les plus divers. Parmi ces derniers, certains amides comme l'urée et le chlorhydrate de guanidine ainsi que les détergents synthétiques (sulfates d'alcool gras, arylalkylsulfonates, détergents à cations actifs) sont les plus employés. Maintenant en effet à l'état dispersé les protéines qu'ils ont dénaturées, ils permettent de travailler en milieu homogène comme l'a remarqué Hopkins pour la 1^{re} fois (23). On peut alors comparer très aisément les propriétés des protéines natives et dénaturées et étudier, en particulier, les variations que subit, au moment de la dénaturation, la « réactivité » de certains de leurs groupements.

Nous nous limiterons ici, dans ce qui va suivre, aux observations faites sur les groupes thiol et phénol, non que nous attachions à ces groupes une importance spéciale mais à cause uniquement de la place qu'ils tiennent dans notre travail. Ce sont sur eux d'ailleurs que l'on sait le plus de choses.

A. — LES GROUPES THIOL.

Les protéines peuvent être classées, en ce qui concerne la réactivité de leurs groupes SH, en 3 catégories principales :

a) Celles, comme l'albumine d'œuf, la sérumalbumine, l'édénine, la globine de cheval et le virus de la mosaïque du tabac dont les SH parfaitement « inertes » dans la protéine native, deviennent brusquement « réactifs » au moment de la dénaturation.

b) Celles, comme la myosine (24) et l'uréease (4), qui contiennent des SH « réactifs » déjà à l'état natif mais qui en contiennent davantage à l'état dénaturé.

c) Celles enfin, comme certaines nucléoprotéines hépatiques ou la kératine (25), qui possèdent autant de SH « réactifs » avant et après dénaturation.

Ces groupes SH sont évidemment apportés aux protéines par des « restes » cystéine que l'on retrouve, moyennant quelques précautions, dans les hydrolysats de ces protéines. C'est ainsi par exemple que 1 mol. d'albumine d'œuf contient 4 « restes » cystéine et 1 reste cystine (26). Mais l'on s'est beaucoup préoccupé de savoir pourquoi tous les SH des protéines (a) et certains SH des protéines (b) ne deviennent « réactifs » qu'après dénaturation.

On a mis tout d'abord en avant des considérations stériques. Les protéines natives possèdent en effet une structure ramassée qui pourrait interdire l'accès des groupes SH aux substances qui réagissent normalement avec eux. La dénaturation, provoquant l'extension des chaînes peptidiques, rendrait alors cet accès plus aisé (27, 28). Mais cette théorie n'explique pas pourquoi les SH de l'albumine d'œuf native, par exemple, quoiqu'ils ne réagissent pas avec l'oxygène, le nitroprussiate, la porphyrindine, le ferricyanure, etc..., réagissent partiellement avec l'iodoacétamide et complètement avec l'iode sans que l'on puisse attribuer un encombrement spatial plus réduit à ces dernières substances. Bien au contraire, certains groupes protéiques (les OH phénoliques en particulier) sont incapables de réagir avec les petits ions OH (29) tandis que d'autres groupes, comme les NH_2 et les COOH , s'unissent facilement à de grosses molécules. L'hypothèse de l'encombrement stérique semble donc devoir être provisoirement écartée.

Signalons ici que la plupart des réactifs caractéristiques des groupes SH (nitroprussiate, porphyrindine, o-iodosobenzoate, etc...) impliquent leur réunion deux par deux en une liaison disulfure. Neurath a récemment supposé (30) que la structure rigide de certaines protéines natives interdisait une telle réunion. Celle-ci serait au contraire possible avec les chaînes plus flexibles des protéines dénaturées. Cette hypothèse demande évidemment que les substances s'unissent à un seul groupe thiol à la fois, réagissent de façon analogue que la protéine soit native ou dénaturée. Or, il ne semble pas que le mode d'action de l'iodoacétamide ou du p-chloromercurobenzoate (33) vérifie bien cette dernière proposition et nous verrons dans la présente thèse que l'étude des agents acylants en démontre le mal-fondé.

D'autres auteurs imaginent, au sein des protéines natives, l'existence de liaisons dans lesquelles les groupes SH se trouveraient impliqués.

Ces liaisons seraient brisées au moment de la dénaturation. On peut évidemment faire appel à de véritables liaisons chimiques comme les ponts disulfure. Cette hypothèse ne résiste d'ailleurs pas à l'examen car la rupture des ponts disulfure ne saurait être attribuée à une réduction (la dénaturation n'implique aucun processus réducteur ou oxydo-réducteur) ou à une hydrolyse (dans certaines protéines dénaturées, tout le soufre cystinique apparaît sous forme de SH). Linderström-Lang (31), d'autre part, suggère que les groupes SH sont bloqués dans des cycles thiazolidine. Ceux-ci s'ouvriraient soit à la dénaturation, soit devant certains réactifs (iode). Cette idée peut être appuyée, quoiqu'assez indirectement, sur quelques faits expérimentaux (32, 33). Elle possède cependant aux yeux de certains auteurs, un grave défaut : c'est de faire intervenir, pour les SH « non-réactifs », un type précis de liaison chimique. Or, cette « non-réactivité », nous la retrouverons pour d'autres groupes. S'il fallait, pour chacun d'entre eux, imaginer un type nouveau et précis de liaison, la structure protéique prendrait un aspect de complexité vraiment décourageant. On peut d'ailleurs objecter ici que la « réactivité » des SH protéiques semble varier beaucoup plus que celle des autres groupes. Il n'est peut-être donc pas interdit d'invoquer pour eux-seuls la présence d'une liaison chimique spécifique.

Quoi qu'il en soit, l'attention se porte maintenant sur les liaisons hydrogène de Pauling. Comme d'autres groupes protéiques, les SH seraient impliqués dans de telles liaisons et ils ne seraient « réactifs » que dans des conditions et vis-à-vis des substances susceptibles de briser ces liaisons.

B. — LES GROUPEMENTS PHÉNOLIQUES.

L'état de plus ou moins grande « réactivité » présenté par les groupes SH protéiques est depuis longtemps connu car on dispose de toute une série de moyens simples pour mesurer cette « réactivité ». Il est clair cependant que d'autres groupements protéiques se comportent à cet égard comme les groupes SH (NH_2 , COOH , disulfure, indol, phénol, etc...).

Parmi ceux-ci, les groupes phénol représentent un cas particulièrement intéressant car, d'une part, leur importance dans les protéines physiologiquement actives a été maintes fois souligné et, d'autre part, l'étude de leur « réactivité » peut être abordée par voie titrimétrique, spectroscopique et chimique.

Les courbes de titrage de l'albumine d'œuf native (39) semblent déjà montrer que les OH phénoliques de cette protéine s'ionisent avec difficulté. Mais, dans ce domaine, la technique spectrographique est d'un précieux secours car l'ion phénate absorbe beaucoup plus entre 2.900 et 3.100 $\text{\AA}$ que la fonction phénol non-dissociée. Crammer et Neuberger (29) observent alors que :

a) Les groupes phénol de l'insuline s'ionisent bien. Leur pK est toutefois notablement plus élevé que celui de la tyrosine (10, 15) mais ce fait est attribué à la charge nette portée par la protéine en milieu alcalin plutôt qu'à un comportement particulier des groupes eux-mêmes.

b) Les groupes phénol de l'albumine native, par contre, ne s'ionisent pas de manière sensible jusqu'à $\text{pH} = 12$. A $\text{pH} = 13$, l'ionisation se produit brusquement, tandis que la protéine se dénature. La dénaturation une fois réalisée, les groupes de l'albumine s'ionisent alors considérablement à $\text{pH} = 12$.

Les auteurs anglais interprètent ces faits en supposant que les groupes phénol de l'albumine native participent à des liaisons hydrogène qui sont brisées au moment de la dénaturation. De telles liaisons n'existeraient pas dans la molécule d'insuline dont la stabilité serait uniquement assurée par des ponts disulfure. Ce très important travail suggère ainsi que la mobilité des atomes d'hydrogène portés par les groupes phénol protéiques est susceptible de varier considérablement soit au moment de la dénaturation de certaines protéines, soit quand on passe d'une protéine à une autre de structure différente.

La voie chimique, d'autre part, peut utiliser soit le pouvoir réducteur qu'exercent les groupes phénol vis-à-vis de certaines substances organiques, soit leur aptitude à l'acylation. Le pouvoir réducteur, en premier lieu, est généralement estimé à l'aide du réactif de Folin auquel la tyrosine, comme d'ailleurs le tryptophane et la cystéine, confère une coloration bleue aisément mesurable. Si ce même réactif est mis au contact d'une protéine que, pour simplifier, nous supposons tout d'abord dépourvue de cystéine, une coloration apparaît également, mais son intensité est beaucoup moins forte que la teneur de la protéine en tyrosine et en tryptophane le laisse prévoir. Le rapport : Coloration mesurée/Coloration calculée est d'ailleurs indépendant de la protéine mise en œuvre et se situe entre 50 et 60 p. 100 (5, 6). Doit-on en conclure que les groupes phénol des protéines sont en partie « dissimulés » ? Il semble que non car les peptides simples de la tyrosine (35), ou, plus généralement, les tyrosines N-substituées (14) ne livrent déjà qu'une fraction de la coloration attendue.

Toutefois, il paraît maintenant admis que le pouvoir réducteur des groupes phénol protéiques augmente au moment de la dénaturation. C'est ainsi, par exemple, que l'albumine d'œuf native ne réduit pas le ferricyanure à $\text{pH} = 9,6$. Mais, une fois dénaturée et privée de ses SH par la cystine (36), elle le réduit à ce même pH. Le pepsinogène, d'autre part, est nettement moins réducteur à $\text{pH} = 8$ que la pepsine. Herriott, qui note ce fait (37), l'attribue à une dénaturation plus poussée de la pepsine dans les conditions de l'expérience. Miller (35), de son côté, pense que les groupes phénol de certaines protéines, par suite d'une dénaturation plus complète consécutive au séjour en milieu alcalin, réduisent mieux le réactif de Folin pendant le dosage colorimétrique selon Herriott à $\text{pH} = 11$ que pendant celui à $\text{pH} = 8$. La différence des résultats fournis par les deux méthodes, communément attribuée à la tyrosine O-acylée et lui servant de mesure, pourrait alors ne lui être due qu'en partie. L'auteur recommande donc l'adjonction systématique d'un détergent au milieu réactionnel afin d'assurer aux protéines un état de dénaturation aussi uniforme que possible. Notons enfin, dans le même ordre d'idées, que la porphyrine oxyde plus facilement les OH phénoliques de l'albumine dénaturée que ceux de l'albumine native (38).

Les recherches entreprises jusqu'ici sur l'acylation des groupes phénol protéiques ont été conduites dans des conditions expérimen-

tales (pH, température, nature de l'agent acylant) extrêmement variées. C'est qu'en effet leur but immédiat n'était pas d'étudier systématiquement le phénomène, mais bien de déterminer ses répercussions sur l'activité physiologique des protéines mises en œuvre. De plus, subissant fortement l'influence du travail fondamental de Herriott et Northrop (5) sur la pepsine, elles ont presque toujours été réalisées en milieu acide où l'acylation des OH phénoliques progresse lentement. Enfin, leur interprétation quantitative n'est vraiment possible que dans le cas particulier de l'acétylation (57, 1).

Pour toutes ces raisons, bien rares sont les résultats obtenus jusqu'ici, qui semblent se prêter à une comparaison réellement instructive.

PARAGRAPHE III.

Rôle des groupes thiol dans l'activité de l'uréase.

L'uréase, obtenue pour la 1^{re} fois à l'état cristallisé par Sumner en 1926 (35) possède tous les caractères d'une protéine pure. Après plusieurs cristallisations, elle contient 8 atomes de soufre par subunité pesant 21.000 — 22.000 g et elle donne une forte coloration avec le nitroprussiate (41), révélant la présence de groupes SH « réactifs ».

Ces groupes SH ont immédiatement attiré l'attention des chercheurs qui ont voulu en connaître le nombre. Sumner (41), le premier, a trouvé que l'intensité de la coloration avec le nitroprussiate laissait supposer la présence de 0,7 p. 100 de cystéine dans l'uréase. Plus tard, Hellerman (43) trouve environ 0,4 p. 100 de cystéine dans l'uréase native en prenant comme détecteur la porphyrindine. Mais, quand on dénature cette uréase par le chlorhydrate de guanidine (4), la teneur atteint 2,85 p. 100 si on opère avec l'iodosobenzoate et 2,3-2,5 p. 100 si l'on opère avec la porphyrindine. Il en résulte donc que, si on considère le chiffre de 21.300 g comme représentant le poids de la subunité d'uréase, celle-ci contient environ 1 SH « réactif » et 4 ou 5 SH totaux.

Le groupe SH « réactif » est appelé (a) par Hellerman qui considère de plus que la « réactivité » des autres SH va en décroissant. Celui dont la « réactivité » vient immédiatement après celle des groupes (a), est nommé (b) par l'auteur américain.

De nombreux travaux ont suggéré depuis longtemps que l'uréase est un « sulfhydryl enzyme » c'est-à-dire un ferment dont l'activité dépend de l'état de ses groupes SH. Mais on s'est rapidement rendu compte que tous les groupes SH n'avaient pas la même importance. En effet, parmi les réactifs oxydants mis en œuvre, le ferricyanure (43) et la porphyrindine diluée (44) ne l'inactivent pas. Une uréase traitée par la porphyrindine diluée et ne donnant plus de test positif au nitroprussiate est encore pleinement active. Par contre, la porphyrindine concentrée arrête l'action fermentaire (43). De même, des agents d'alkylation peu puissants comme l'iodoacétate ou l'iodoacétamide dilués sont sans action tandis que l'iodoacétamide plus concentré inhibe le ferment (44). Mais c'est le très beau travail d'Hellerman (4) qui a projeté une vive lumière dans ce domaine. L'auteur américain traite tout d'abord l'uréase par le p-chloromercuribenzoate et il observe que la 1^{re} molécule de cette substance (pour 21.300 g d'uréase) ne fait pas baisser l'activité. La 2^e molécule par contre entraîne une inactivation qui est réversible par addition de cystéine. De plus, l'uréase traitée préalablement par la porphyrindine ou l'iodoacétamide dilués ne nécessite plus que 1 mol. du dérivé mercurique pour être réversiblement inactivée.

Hellerman en conclut que les SH les plus « réactifs » de l'uréase

(groupes (a)) ne sont pas essentiels mais que ceux dont la « réactivité » est immédiatement inférieure (groupes (b)) jouent un rôle primordial dans le ferment.

Le seul point faible de ce travail, par ailleurs fort ingénieux, est qu'il établit une simple relation stoechiométrique entre le p-chloromercurobenzoate et le ferment. Aucun dosage de SH libres n'a été fait au cours du traitement.

Le p-chloromercurobenzoate est un réactif formateur de mercaptides, introduit dans la chimie des protéines par Hellerman (43, 65). Cet auteur le propose même sur le plan quantitatif en mesurant la quantité du réactif nécessaire à l'abolition du test au nitroprussiate. Il semble donc bien que cette substance ait une grande affinité pour les SH « réactifs » et qu'elle se combine stoechiométriquement avec eux. Toutefois, Anson (33) remarque, quoique de façon assez indirecte, que le p-chloromercurobenzoate présente une très faible affinité pour les SH « non réactifs » de l'albumine native. L'absence de dosage des SH dans le travail d'Hellerman est donc regrettable. Si, en effet, on peut penser que la 1^{re} mol., de p-chloromercurobenzoate bloque bien les SH (a) de l'uréase, il n'est pas du tout sûr que la 2^e mol. (ou la 1^{re} après abolition des SH (a)) bloque intégralement un nouvel SH.

La relation stoechiométrique que cet auteur établit entre inactivation et disparition des SH (b) paraît alors douteuse.

CHAPITRE II.

TECHNIQUES UTILISÉES.

PARAGRAPHE I.

Séparation des acides aminés par ionophorèse.

La courbe de dissociation des amino-acides affecte, comme on le sait, une forme en cloche délimitant une zone isoélectrique plus ou moins large. La position de cette zone dans l'échelle des pH est évidemment fonction de la nature des groupements *R* des amino-acides : Le groupement *R* est-il incapable ou peu capable de s'ioniser ? On a affaire aux acides monoaminomonocarboxyliques dont la zone isoélectrique, fort large, va de $\text{pH} = 4$ à $\text{pH} = 8$ environ. Le groupement *R* a-t-il des propriétés basiques ? On a affaire aux bases hexoniques dont les zones isoélectriques, beaucoup plus étroites, s'échelonnent entre 7,5 (histidine) et 10,75 (arginine). Le groupement *R* enfin a-t-il un caractère acide ? On se trouve en présence des acides monoaminés dicarboxyliques dont les zones isoélectriques, également étroites, se trouvent aux environs de $\text{pH} = 3$. Le simple examen des courbes de dissociation de ces 3 classes d'amino-acides permet de constater que, autour de $\text{pH} = 5$:

1°) Les acides monoaminés monocarboxyliques, se trouvant dans leur zone isoélectrique, sont électriquement neutres.

2°) La dissociation acide des bases hexoniques est pratiquement nulle tandis que leur dissociation basique est totale. Elles seront donc chargées positivement.

3°) La dissociation basique des dicarboxyliques est nulle tandis que leur dissociation acide est complète. Ils seront donc chargés négativement.

Supposons alors que l'on place un mélange d'aminoacides à $\text{pH} = 5$ dans le compartiment médian d'un appareil à 3 compartiments séparés par des membranes convenables. Remplissons d'eau distillée les 2 compartiments extrêmes et plongeons dans chacun une électrode reliée à une source de courant continu. Sous l'influence du champ électrique ainsi créé, les amino-acides basiques migreront à la cathode,

les dicarboxyliques iront à l'anode et les autres resteront dans le compartiment médian. C'est la technique de séparation dite par ionophorèse (45). La mise en œuvre de cette technique est d'ailleurs délicate car, d'une part, les acides, arrivant dans le liquide anodique très oxydant, y sont aisément désaminés et, d'autre part, des phénomènes d'électroendosmose et de dialyse simple à travers les membranes rendent la séparation moins nette qu'il vient d'être indiqué. Ces divers inconvénients peuvent être évités dans une certaine mesure soit en utilisant une anode soluble, soit en choisissant soigneusement la nature des membranes (parchemin à l'anode, gélatine formolisée à la cathode) soit enfin en conduisant l'ionophorèse non dans un milieu liquide séparé par des membranes mais dans un gel de silice (46).

Au cours de notre travail, nous avons utilisé la technique de Kuhn et Desnuelle (47) qui permet de séparer quantitativement les bases hexoniques par 3 ionophorèses successives dans l'appareil horizontal de Pauly.

PARAGRAPHE II.

Diverses techniques colorimétriques.

A. — HISTIDINE.

Avant de procéder au dosage de l'histidine, nous l'avons séparée par ionophorèse des autres amino-acides interférant avec elle. Parmi ceux-ci, la tyrosine est réputée fort gênante. Notre expérience personnelle est que, en ce qui concerne le dosage d'après Jorpes tout au moins, elle est beaucoup moins gênante qu'on le dit. Sur le liquide cathodique, nous appliquons soit la technique de Jorpes, soit celle de Kappeler-Adler qui sont beaucoup trop classiques pour que nous les décrivions en détail ici. Signalons simplement que ces deux techniques sont sensibles à la présence des ions acétiques qui nous servent de tampon au cours de nos acétylations. Ces ions doivent donc être très soigneusement éliminés avant de procéder au dosage. Si l'on travaille sur une protéine, l'élimination se fait par dialyse. Si c'est un cristalloïde qui est en jeu, on procède à plusieurs évaporations à sec sous vide et en présence de SO_4H_2 en faible excès.

B. — DOSAGE DES GROUPES THIOL PROTÉIQUES.

Les techniques de dosage des groupes thiol protéiques reposent pour la plupart sur leur oxydation. L'agent d'oxydation est alors réduit et c'est l'étendue de cette réduction que l'on mesure. Il y a lieu évidemment de différencier les SH « réactifs » des SH « non réactifs » (voir chapitre précédent). Les premiers sont dosés sur la protéine native. Pour atteindre les seconds, on doit dénaturer la protéine ; on détermine ainsi les SH totaux auxquels on retranche les SH « réactifs ».

Les premiers essais de dosage ont été effectués sur de l'albumine d'œuf coagulée par la chaleur : c'était le mode de dénaturation le plus simple. Mirsky et Anson (48) ont fait agir un excès de cystine ou de ferri cyanure sur le coagulum d'albumine et ont dosé la quantité de cystéine ou de ferrocyanure formés. Kuhn et Desnuelle (49) ont toujours utilisé l'albumine coagulée par la chaleur mais ils ont fait agir sur elle la porphyrindine qui oxyde stoechiométriquement les thiols à froid en se transformant en leucobase incolore. En mesurant la quantité de réactif susceptible d'être décoloré par un poids donné de coagulum, ces auteurs ont assigné à ce dernier une teneur en cystéine de 0,55 p. 100. Peu après, Greenstein (50), au lieu de travailler sur un coagulum, a dosé les SH sur la protéine en dispersion dans un dénaturant (urée, chlorhydrate de guanidine ou détergent). C'est la quantité de porphyrindine nécessaire à l'abolition du test au nitroprussiate qui est alors mesurée. La teneur en cystéine de l'albumine d'œuf

est, dans ces conditions, de 1 p. 100 si l'agent dénaturant est l'urée et de 1,28 p. 100 si c'est le chlorhydrate de guanidine.

Ces chiffres soulèvent deux problèmes :

1°) La teneur en cystéine de l'albumine dénaturée en milieu homogène est environ le double de celle trouvée dans le coagulum.

2°) La teneur en cystéine de l'albumine dénaturée en solution semble dépendre du dénaturant.

De nombreux travaux ont confirmé le 1^{er} résultat de Greenstein : La teneur en cystéine de l'albumine dénaturée en milieu homogène varie actuellement de 1,0 à 1,3 p. 100 suivant les auteurs. Le fait que l'on trouve plus de SH dans des solutions d'albumine dénaturée que dans le coagulum précipité par la chaleur a été discuté à fond par Anson (51). Dans le cas du coagulum, l'agent dénaturant, c'est-à-dire la chaleur, a disparu au moment du dosage et il peut se produire des phénomènes d'agrégation postérieurs à la dénaturation. Ces phénomènes sont susceptibles de faire disparaître en partie les SH réactifs. Par contre, le 2^e point soulevé par le travail de Greenstein a été critiqué par Mirsky (28) qui attribue aux 3 dénaturants une efficacité comparable pourvu qu'ils soient utilisés à des concentrations convenables. Quoi qu'il en soit, Greenstein a mesuré, grâce à sa technique, la teneur en SH « réactifs » et « non-réactifs » de nombreuses protéines et les valeurs qu'il indique sont encore considérées généralement comme exactes.

Mirsky et Anson ont, d'autre part, perfectionné leur technique au ferricyanure. Comme nous la décrivons en détail plus loin, nous n'en dirons pas plus pour l'instant sur elle.

L'o-iodosobenzoate de Na a été employé par Hellerman et coll. (52) pour doser les SH de l'albumine dénaturée par le chlorhydrate de guanidine. L'iode libérée est dosée en solution acide. Ces auteurs trouvent 1,29 p. 100 de cystéine dans l'albumine d'œuf. D'autres oxydants ont également été proposés : le réactif de Folin (acide urique) (53) et le tétrathionate (33). On peut également utiliser le p-chloromercuribenzoate de Na (33) qui n'est pas un oxydant mais une substance « formant des mercaptides ».

Enfin, il a été trouvé par Anson (33) que les groupes SH de l'albumine native pouvaient être dosés par l'iode à 0°.

On voit que le choix des méthodes est grand. C'est donc qu'aucune n'est pleinement satisfaisante. Il a été reproché (38) à la porphyrindine d'être un oxydant trop fort pouvant oxyder non seulement les SH mais d'autres groupes comme les OH phénoliques ; sa préparation est d'ailleurs difficile et elle est instable. Dans le dosage de l'iodosobenzoate, il est à craindre que l'iode libéré puisse réagir sur la protéine. De plus, dans les mains de certains expérimentateurs, il donne des résultats manifestement trop forts (54). Il faut remarquer aussi que les oxydations ayant pour point final le test au nitroprussiate sont assez sujettes à caution car de faibles traces de métaux lourds inhibent ce test. Il convient alors d'ajouter un peu de cyanure mais en quantité insuffisante pour transformer les groupes disulfure en thiol.

Nous avons, au cours du présent travail, choisi la méthode au ferricyanure de Mirsky (28) qui est d'ailleurs analogue dans son principe à celle publiée à la même époque par Anson (55, 33). Elle nous a paru

en effet la plus commode et la plus précise. Dans de nombreux essais, ces auteurs ont recherché les précautions à prendre pour ne doser que les groupes SH. Le pH du milieu, surtout, présente une importance capitale. Il doit être de 6,7 exactement car, au-dessous, les SH sont mal oxydés et, au-dessus, les OH phénoliques commencent à interférer. Cette méthode ne dose certainement que les SH car, dès qu'ils ont disparu, le ferricyanure ne se réduit plus. Mais, est-on sûr de doser complètement ces groupes ? La question est évidemment plus délicate à résoudre car nous trouvons avec Mirsky des valeurs pour l'albumine d'œuf qui sont systématiquement 10 p. 100 au-dessous de celles communément admises. Nous avons toutefois accepté ce risque car une erreur par défaut est de moindre importance dans notre travail qu'une erreur par excès.

Nous résumons tout d'abord brièvement notre mode opératoire dans le cas de l'albumine d'œuf non traitée : a cm³ d'une solution contenant 10-20 mg. de protéine (100-200 γ de « —SH » (*)) sont mélangés à (2,25 — a) cm³ d'eau, 0,05 cm³ de tampon phosphate M (pH = 6,7), 0,05 cm³ d'une solution fraîche de ferricyanure de K 0,1 M et 0,5 cm³ de dodécylsulfate de Na à 10 p. 100. On laisse l'oxydation se dérouler 10 min. à 37° puis on transvase le mélange dans un ballon jaugé de 20 cm³ en lui ajoutant 0,4 cm³ de SO₄H₂ N. Après avoir complété au trait, on prélève 5 cm³ sur lesquels on dose colorimétriquement le ferrocyanure formé en le transformant en bleu de prusse. A ce stade du dosage, une nouvelle addition de détergent permet de maintenir la protéine et le pigment à l'état dispersé. Elle évite donc, d'une part, la précipitation préalable de la protéine par le tungstate de Na et, d'autre part, l'emploi bien peu pratique de gomme-gutte. Les 5 cm³ précédents sont donc mélangés à 0,1 cm³ de ferricyanure 0,1M, 0,5 cm³ de dodécylsulfate à 10 p. 100 et 1 cm³ de sulfate ferrique (*). On attend 5 min., on ajoute 6,5 cm³ d'eau et on mesure au photocolorimètre l'intensité de la coloration bleue apparue (filtre Wratten n° 27). Une courbe de référence est préalablement tracée en utilisant une solution dans le ferricyanure d'un échantillon de cystéine cristallisée de pureté connue. Si l'échantillon d'albumine est insoluble dans l'eau, on le disperse dans le dodécylsulfate.

Quant à la kératine, elle est dissoute dans un tampon phosphate à pH = 6,7, oxydée par le ferricyanure puis précipité par le tungstate de Na avant le dosage colorimétrique selon la méthode Mirsky.

Pour l'uréase, nous employons successivement les 2 méthodes : le dosage des groupes SH « réactifs » est semblable à celui des SH de la kératine et les SH totaux sont déterminés suivant la technique utilisée pour l'albumine dénaturée.

Signalons ici que nous avons vérifié que la quantité de dodécylsulfate utilisée était suffisante pour faire apparaître tous les SH de l'albumine à l'état « réactif », ceci en opérant le traitement au ferricyanure en présence de quantités régulièrement croissantes de dé-

(*) Dans ce qui suit, les résultats de ces dosages seront calculés en cystéine et présentés sous le symbole « —SH ».

(*) On traite à l'ébullition 0,5 g. de sulfate ferrique anhydre par 17,5 cm³ de SO₄H₂ 2N puis on amène à 100 cm³ avec de l'eau et filtre.

tergent (Tableau I). Rappelons que le dosage selon Mirsky s'effectue en présence de 1,75 p. 100 de dodécylsulfate.

TABLEAU I.

Teneur apparente en cystéine de l'albumine d'œuf cristallisée en présence de quantités variables de dodécylsulfate.

Concentration en dodécylsulfate (p. 100)	Teneur apparente en cystéine ("—SH" p. 100)
0,035	0,00
0,105	0,29
0,175	0,52
0,245	0,80
0,350	0,80
1,05	0,94
1,75	1,00

Par ailleurs, nous donnons dans le tableau II, les éléments de la courbe de référence permettant les dosages colorimétriques. Chaque dosage est toujours accompagné d'un témoin qui est retranché.

TABLEAU II.

Eléments de la courbe de référence de dosage des —SH protéiques par le ferricyanure de potassium.

Un poids connu de chlorhydrate de cystéine, dont la pureté est obtenue par iodométrie, a été dissous dans un volume déterminé de ferricyanure. Cette solution a été ensuite traitée comme d'habitude. Notre manière de faire élimine ainsi tout danger d'oxydation de la cystéine à l'état dissous.

Photocolorimètre. Filtre Wratten n° 27. Cuve de 1cm.

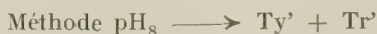
Cystéine (γ)	Lectures	Cystéine (γ)	Lectures
224	235	44,6	37
180	190	28	12
90	95		

C. — DOSAGE DES GROUPES PHÉNOL PROTÉIQUES.

Le problème du dosage du groupe phénol dans les protéines est beaucoup plus délicat encore que celui du dosage des SH. Les propriétés fortement réductrices de ces derniers permettent en effet de trouver des conditions assurant leur oxydation sélective. Au contraire, les OH phénoliques sont de plus faibles réducteurs et, dans les conditions expérimentales où ils s'oxydent, d'autres groupes protéiques vont également s'oxyder : ce sont, d'une part évidemment, les SH quand ils sont présents à l'état « réactif » et, d'autre part, les noyaux indol du tryptophane. A la réduction correspondra donc une

somme tyrosine + tryptophane + cystéine que l'on exprimera en tyrosine par le jeu de coefficients d'équivalence.

Le travail de base effectué dans ce domaine est celui d'Herriott (6). Il utilise la réduction par les protéines à pH = 8 du réactif des phénols selon Folin (56). Le réactif prend alors une coloration bleue dont l'intensité est mesurée et comparée à celle que fait apparaître, dans les mêmes conditions, des quantités connues de tyrosine. Cette technique a eu pour but principal de faire connaître le degré d'acétylation des OH phénoliques dans la pepsine. Ce degré peut être trouvé de la manière suivante : dans un premier essai, la protéine est simplement traitée par le réactif et son pouvoir chromogène est mesuré. Comme la pepsine ne contient pas de SH, ce pouvoir est proportionnel à la tyrosine (Ty') et au tryptophane (Tr') non bloqués. On peut donc écrire :



Dans un autre essai, la pepsine est maintenue quelques instants à pH = 11 avant le dosage. Les radicaux O-acétyle sont alors hydrolysés tandis que l'acétyltryptophane n'est pas touché. On a donc :



La différence entre les deux essais donne ainsi la tyrosine acétylée, soit Ty — Ty'.

Cette technique a été utilisée après Herriott par de nombreux expérimentateurs qui, essayant de l'appliquer, aveuglément, ont quelquefois rencontré des difficultés. Ces difficultés sont de 2 ordres principaux :

1°) Miller (35) a trouvé que, dans certains cas, les protéines étaient bien dénaturées à pH = 11 mais mal à pH = 8. Comme les OH phénoliques présentent une « réactivité » plus grande dans les protéines dénaturées, on peut craindre que la différence entre les colorations pH₈ et pH₁₁ ne soit pas due entièrement à la saponification de liaison O-acétyle mais bien aussi à cette augmentation de « réactivité ». Il propose de dénaturer systématiquement les protéines avant de passer au dosage.

2°) Les radicaux acétyle n'ont aucune influence sur le réactif de Folin. Mais il n'en est pas de même d'autres masques, comme, en particulier, les radicaux phényluréidés. Ces derniers par hydrolyse à pH = 11, donnent de l'aniline qui réduit le réactif de Folin. Pour faire face à cet inconvénient, Miller (57) préconise l'emploi d'un coefficient de correction. Notre expérience personnelle est que, dans ces conditions, le dosage est pratiquement impossible et nous avons renoncé à suivre l'acylation des OH phénoliques par l'isocyanate de phényle.

Nous décrirons ci-après en détail la méthode de Miller (35) que nous avons utilisée :

1°) à pH 8.

A x cm³ de solution, contenant 20 à 30 γ de tyrosine ou une quantité équivalente de protéine, sont ajoutés (1—x) cm³ d'eau, 0,1 cm³ ClH $\frac{N}{5}$ et 0,2 cm³ de dodécylsulfate de Na à 10 p. 100. Après 3 min., 0,1 cm³ NaOH $\frac{N}{5}$, 1 cm³ du réactif de Folin dilué et 2 cm³ de tampon phosphate sont ajoutés et la solution est laissée 15 min. à 35°5.

2°) à pH 11.

L'hydrolyse des liaisons O—acétyle se fait sans détergent qui ralentit cette hydrolyse. A x cm³ de solution, sont ajoutés (1-x) cm³ d'eau et 0,1 cm³ de NaOH $\frac{N}{5}$. Après 10 min., 0,2 cm³ de détergent et 0,1 cm³

ClH $\frac{N}{5}$ sont ajoutés et le dosage est continué comme précédemment.

Le tampon est composé de 9 parties de phosphate disodique 0,5 M et 1 partie de NaOH à 10 p. 100. Le réactif de Folin est dilué de telle façon que 1 cm³ de ce réactif + 2 cm³ de tampon + 1 cm³ d'eau se trouvent à pH 7,7 après 10 min. de contact.

La coloration bleue apparue est mesurée dans les 2 cas au photocolorimètre (filtre Wratten n° 27). Elle permet de calculer un certain pourcentage de « tyrosine » pour la préparation protéique étudiée.

Avant maintenant de calculer à partir de ces dosages le pourcentage de tyrosine acylée, nous croyons utile de faire certaines remarques qui ne ressortent pas clairement des travaux publiés jusqu'ici :

a) *La substance étudiée est un dérivé simple de la tyrosine ou une protéine qui, comme l'insuline, ne contient ni tryptophane ni cystéine.*

Le pourcentage de tyrosine est évidemment donné par le rapport simple :

$$\frac{\text{« pH 11 »} - \text{« pH 8 »}}{\text{« pH 11 »}} \times 100$$

b) *La protéine étudiée contient, comme la pepsine, du tryptophane, mais pas de cystéine.*

Le numérateur du rapport (1) exprime toujours la quantité de tyrosine acétylée (colorimétrique) car l'acétyltryptophane n'est pas saponifié à pH = 11. Mais la valeur « pH 11 », qui se trouve au dénominateur, représente en fait une somme tyrosine + tryptophane (exprimé en tyrosine). Cette valeur ne peut donc servir au calcul qu'après lui avoir retranché ce qui revient au tryptophane.

c) *La protéine étudiée contient à la fois, comme l'albumine d'œuf, du tryptophane et de la cystéine.*

Remarquons tout d'abord que les groupes SH de l'albumine, rendus « réactifs » par le détergent présent au moment du dosage, vont exercer un pouvoir réducteur propre. Le numérateur du rapport (1) ne représentera la tyrosine acétylée (colorimétrique) que si la cystéine (acétylée ou non) se comporte comme le tryptophane, c'est-à-dire si elle possède le même pouvoir chromogène à pH = 8 qu'à pH = 11. Cette hypothèse n'est évidemment pas tout à fait exacte car, d'une part, les groupes thiol sont assez labiles à pH = 11 et, d'autre part, les liaisons S-acétylées s'hydrolysent notablement à ce même pH. Les deux phénomènes, exerçant sur le dosage des effets contraires, vont tendre dans une certaine mesure à se compenser. Il faut toutefois s'attendre à ce que les résultats du dosage soient un peu trop faibles quand quelques fonctions SH seulement auront été acétylées (cas de l'albumine native) mais soient légèrement par excès quand beaucoup de SH auront été acétylés (cas de l'albumine dénaturée). De nombreux essais nous ont d'ailleurs montré que les erreurs entraînées par la

présence des SH n'affectent en aucun cas la signification générale des résultats qui seront exposés plus loin (*).

Quant à la tyrosine totale (colorimétrique), elle se déduira du pouvoir chromogène de la protéine initiale en lui retranchant ce qui revient au tryptophane et à la cystéine. Après avoir déterminé les coefficients d'équivalence nécessaires, nous avons trouvé par exemple que l'albumine d'œuf contient 2,5 p. 100 de tyrosine totale (colorimétrique).

Dans le tableau III, enfin, nous avons rassemblé les éléments de la courbe de référence du dosage selon Miller.

TABLEAU III.

*Eléments de la courbe de référence du dosage
des OH phénoliques selon Miller.*

Photocolorimètre. Filtre Wratten n° 27. Cuve 1 cm.

Tyrosine (γ)	Lectures
10	112
15	170
20	225
25	285
30	340

(*) Notons d'ailleurs qu'il pourrait à priori sembler plus simple de chercher à débarrasser la protéine de ses groupes SH, par traitement à l'iode en particulier. Toutefois, malgré les affirmations d'ANSON, il nous a été impossible d'obtenir, par addition d'une quantité d'iode légèrement supérieure à la quantité calculée, une albumine ne réduisant plus le ferricyanure en présence de dodécylsulfate. Nous avons alors pensé qu'un excès d'iode risquait d'attaquer les restes tyrosine dont nous nous proposons d'étudier le comportement et nous avons préféré travailler avec la protéine normale.

PARAGRAPHE III.

Diverses préparations

1° PRÉPARATION DE L'URÉASE.

a) *Technique de dosage de l'activité (A) et définition de l'unité uréasique (U).*

L'uréase a pour substrat l'urée qu'elle transforme en carbonate d'ammonium.

Pour doser l'activité de cet enzyme au laboratoire nous le faisons agir, dans des conditions bien déterminées, sur un fort excès d'urée et nous dosons la quantité d'ion ammonium formé grâce à la coloration qu'il donne avec le réactif de Nessler (58). Nous mesurons cette intensité au photocolorimètre et nous la comparons à une courbe étalon tracée avec des solutions connues de sulfate d'ammonium (Tableau IV).

TABLEAU IV.

Eléments de la courbe de référence du dosage colorimétrique de l'ion ammonium.

Photocolorimètre. Filtre Wratten n° 47. Cuve 1 cm.

N—NH ₃ (γ)	Lectures
128	54
170	74
511	214
589	239
670	266

On remarque que la courbe susceptible d'être tracée à partir de ces chiffres n'est strictement rectiligne qu'entre 350 et 650 γ de N—NH₃. C'est dans ce domaine que nous avons fait la plupart de nos dosages.

Par convention, l'activité d'une solution uréasique correspond au nombre de mg. de N—NH₃ qu'elle peut former à partir d'un fort excès d'urée, pendant 5 min., à 20° et à pH 7. Elle s'exprime par un certain nombre d'unités (U), chaque unité correspondant à 1 mg. de N—NH₃.

La technique de dosage proposée par Sumner (40) convient seulement à une solution uréasique déjà fortement purifiée. En effet, lorsque nous avons voulu l'appliquer au dosage de l'activité de solutions encore très impures, nous avons constaté que le réactif de Nessler provoque une précipitation importante due à la présence de protéines étrangères. Cette précipitation interdit tout dosage colorimétrique.

Nous avons alors adopté la modification de Fischer (59) qui évite cette précipitation et avons conduit le dosage de la manière suivante :

Dans un tube bouché émeri, 1 cm³ de solution uréasique (renfermant 0,4-0,8 U) est ajouté à 1 cm³ de solution contenant 3 p. 100 d'urée, 4,25 p. 100 PO₄H₂K et 5,4 p. 100 PO₄HK₂. Ce mélange est maintenu 5 min. à 20°. On en prélève 1 cm³ qui est versé dans 5 cm³ d'une solution bouillante d'acide trichloracétique à 5 p. 100. Après refroidissement, on filtre et on met 1 cm³ du filtrat dans un ballon jaugé de 20 cm³ avec environ 15 cm³ d'eau distillée et 10 gouttes de réactif de Nessler. On complète au trait avec de l'eau distillée. Après 10 minutes, la coloration formée est mesurée au photocolorimètre (Filtre Wratten n° 47).

b) *Détermination de l'azote protéique d'une solution d'uréase. Pureté de cette solution (Ug.).*

Afin de suivre la purification de l'enzyme, il est nécessaire de définir une « pureté ». Cette pureté sera fonction, d'une part, de l'activité de la solution protéique, et, d'autre part, de la teneur en azote protéique (NP). La détermination de NP se fait de la façon suivante :

Dans un tube de centrifugeuse, on mélange x cm³ de solution d'uréase (contenant 2 à 3 mg NP) et $\frac{x}{2}$ cm³ d'acide trichloracétique à 50 p. 100. Il se forme un précipité qui est lavé 4 fois avec de l'acide trichloracétique dilué puis transféré quantitativement dans un matras. La teneur en azote de ce précipité donne le NP de la solution primitive. Ce NP étant connu, nous le multiplions par $\frac{160}{17}$ et obtenons un certain poids de protéine. Nous sommes alors à même de mesurer la pureté de la préparation, qui est définie comme étant l'activité présentée par 1 g de protéine. Rappelons ici que la pureté de l'uréase cristallisée est environ de 130.000 U.

c) *Préparation proprement dite.*

L'uréase a été le premier ferment obtenu à l'état cristallisé. Sumner, après plusieurs années de recherches, a pu en effet l'obtenir dans cet état à partir de farine de « Jack beans » (*Canavalia Ensiformis*). Une autre technique a été décrite récemment par Hellerman (4) qui semble mieux adaptée à l'obtention de grosses quantités d'enzyme.

Sumner extrait la farine de Jack beans (fournie par la maison Arlco) à 22° par de l'acétone à 31,5 p. 100. Il se sert de 100 g de farine qu'il agite pendant 3 à 5 min. avec 500 cm³ d'acétone à 31,5 p. 100 puis il filtre et il met le filtrat à la glacière. Après une nuit, une petite portion de son uréase a cristallisé. Les cristaux sont redissous dans de l'eau distillée. La solution ainsi obtenue peut être utilisée telle quelle dans la plupart des cas. Si l'on veut augmenter la pureté de l'enzyme, on peut recristalliser (60) mais les pertes sont alors sévères.

Hellerman fait son extraction sur une plus grande quantité de farine : 800 g de farine sont divisés en portions de 200 g et chaque portion est extraite (à 32°, pendant 10 min. et en agitant doucement) avec 1 litre d'acétone à 31,5 p. 100. Le mélange est ensuite filtré sous

vide. Hellerman fait alors passer la teneur du filtrat en acétone de 31,5 p. 100 à 50 p. 100. Il obtient ainsi un abondant précipité contenant la totalité de l'uréase du filtrat mais aussi beaucoup de protéines étrangères. Il purifie ensuite son uréase par plusieurs cristallisations en présence de phosphate et d'acétone.

Les précautions à prendre pour éviter d'inactiver le ferment sont naturellement les mêmes dans les deux méthodes :

a) Se servir de matériel extrêmement propre.

b) N'employer que de l'eau bidistillée dans du verre, la moindre trace de métaux lourds pouvant inactiver le ferment.

c) Distiller l'acétone commerciale sur du chlorure de calcium fondu et une petite quantité de chaux sodée pour enlever l'eau et les acides.

d) Eviter toute élévation de température au dessus de 30°.

Nous avons essayé en premier lieu la méthode de Sumner qui nous paraissait la plus simple et la plus rapide. Nos premiers essais ont porté sur 20 g de farine Arlco.

Nous avons été arrêtés en premier lieu par l'extraction de la farine. Cette dernière, agitée simplement dans de l'acétone à 31,5 p. 100 à 22° n'abandonne qu'une très faible portion de son activité à la phase liquide. L'extraction par l'acétone à 27 et 22 p. 100 fait monter considérablement l'activité du filtrat mais augmente aussi beaucoup sa teneur en protéines étrangères. Finalement, nous avons remarqué qu'en triturant la farine au mortier pendant 10 min. dans de l'acétone à 31,5 p. 100 au lieu de l'agiter simplement, nous obtenions un filtrat actif (voir schéma ci-après). Nous avons alors adopté ce mode d'extraction. Mais le filtrat, laissé dans la glacière une nuit selon Sumner, n'a donné naissance qu'à un léger trouble non-cristallin. Cette difficulté de préparer l'uréase selon les directives de Sumner ne nous est pas particulière. Elle a été rencontrée par de nombreux auteurs avec certaines qualités de farine. Nous avons alors renoncé à la technique de Sumner et nous avons adopté la méthode d'Hellerman, sans toutefois la suivre jusqu'au bout.

Nous résumons ci-après notre préparation (se reporter au schéma I) : 200 g de farine Arlco sont triturés au mortier avec 1 l. d'acétone à 31,5 p. 100 (température 22° C). La suspension est essorée sur filtre à plis puis le résidu est séché aussi bien que possible sur Büchner. Les liquides sont réunis et additionnés d'acétone pure jusqu'à ce que la concentration du solvant (vol/vol) atteigne 42 p. 100. Après une nuit passée à la glacière, le mélange est centrifugé rapidement. Le liquide surnageant (L_2) ne contient presque plus d'uréase. Le précipité est lavé par 1,6 cm³ d'eau glacée que l'on sépare immédiatement par centrifugation. On obtient ainsi un liquide (L_3) actif mais très impur. Il n'est donc pas utilisé. Le culot de centrifugation est ensuite traité par 2,5 cm³ d'eau et ce mélange est laissé 5 h. à la glacière où il est fréquemment agité. Au bout de ce temps, il est centrifugé au froid jusqu'à obtention d'un liquide (L_4) clair (4 h. environ). Le résidu solide est encore extrait 2 fois à l'eau dans les mêmes conditions (liquides (L_5) et (L_6)). Ce sont ces derniers liquides que nous avons acylés.

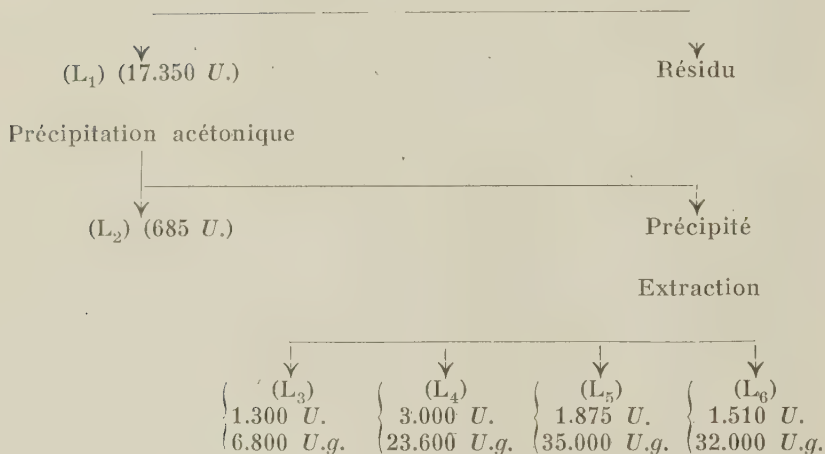
Les chiffres du schéma I font apparaître que les liquides (L_4), (L_5) et (L_6) contiennent, à côté d'uréase, des quantités encore notables de protéines étrangères. Toutefois, comme nous le verrons par la suite, ces protéines ne sont pas gênantes car elles ne possèdent aucun groupe thiol « réactif » ou « non réactif ». Les liquides précédents ont donc pu être utilisés directement sans purification supplémentaire.

SCHEMA I.

Préparation des solutions d'uréase.

200 g de farine Arlco (42.000 U.).

Extraction et filtration



2° PRÉPARATION DE L'ALBUMINE D'ŒUF CRISTALLISÉE.

La préparation de cette protéine est classique et nous n'avons pas à y revenir. Signalons cependant que la teneur en SH d'une solution d'albumine cristallisée présente, après un certain temps de séjour à la glacière, des variations brusques et inexplicables. Il est donc plus commode de sécher à l'air les cristaux de protéine imprégnés de sulfate d'ammonium et de les utiliser au fur et à mesure des besoins après dissolution et dialyse.

3° PRÉPARATION DE LA KÉRATÉINE.

Cette préparation a été faite selon Goddard et Michaelis (31) en dissolvant des cheveux humains dans une solution alcaline de CNK. Après précipitation de l'acide acétique et séchage, le produit obtenu est insoluble dans l'eau mais il est soluble dans les solutions neutres de phosphate. Il contient : 13,5 p. 100 d'N et 1,2 p. 100 de « —SH »

(calculé en cystéine). Cette dernière teneur n'est pas augmentée par la présence de dodécylsulfate de Na.

4° PRÉPARATION DU DODÉCYLSULFATE DE Na.

Les propriétés dénaturantes et solvantes que présentent les esters sulfuriques d'alcools gras vis-à-vis des protéines sont bien connues et ont donné lieu à d'intéressantes applications. Toutefois, on s'est contenté jusqu'ici, même dans des recherches de laboratoire, d'employer des préparations industrielles assez mal définies, vendues sous le nom de « Duponol ».

Pensant qu'il est préférable que chacun travaillât avec un produit pur et standard, nous proposons l'emploi du dodécylsulfate de Na dont nous résumons ci-après la synthèse (62) : à une solution d'alcool laurique (0,5 mol.) dans 125 cm³ de chloroforme, on ajoute goutte à goutte, en agitant bien et en maintenant la température entre 0° et 5°, 0,55 mol. de chlorhydrine sulfurique. On laisse le mélange revenir à 20° et on insuffle de l'air à sa surface, ce qui a pour effet d'éliminer l'acide chlorhydrique. On verse 300 cm³ d'eau glacée, on neutralise à une température inférieure à 20° par de la soude concentrée (0,61 mol.), on évapore au bain-marie bouillant jusqu'à consistance sirupeuse (en maintenant, si besoin est, la réaction alcaline par un peu de soude) puis on sèche sous vide. La poudre obtenue est ensuite lavée 3 fois par 500 cm³ d'acétone anhydre puis elle est extraite à l'alcool absolu bouillant. Les extraits alcooliques, une fois concentrés, laissent cristalliser le dodécylsulfate par refroidissement.

5° PRÉPARATION DU CÉTÈNE.

Le cétène est obtenu selon Herriott (8) par pyrolyse de vapeurs d'acétone au contact d'un fil de tungstène chauffé électriquement. Le mélange gazeux, après avoir circulé dans un long réfrigérant ascendant et un piège maintenu à 0°, barbote dans la solution protéique à la vitesse de une bulle par seconde environ. Le cétène, comme l'indique Fraenkel-Conrat, peut aussi être dissous dans l'éther de pétrole froid. Une fois saturé, cet éther est réchauffé lentement et le gaz qui s'en échappe est envoyé dans la solution protéique. Nous avons utilisé cette dernière technique, permettant un réglage beaucoup plus précis du débit, pour toutes les expériences de longue durée. Dans des expériences stoechiométriques qui seront décrites plus loin, on prépare une solution titrée de cétène dans l'éther et c'est une partie aliquote de cette solution qui est ajoutée à la protéine.

PARAGRAPHE IV.

Mise en œuvre des acylations.

1° ACYLATION SIMPLE EN PRÉSENCE DE TAMPON.

Nous croyons utile de décrire ci-après un exemple concret de cette opération :

Dans un mélange refroidi de 5 cm³ d'albumine à 3,25 p. 100 et 5 cm³ d'un tampon 2M acétate (pH = 5,6) ou phosphate (pH = 7,5), on fait barboter pendant un temps déterminé du cétène provenant, soit directement de l'appareil générateur, soit d'une solution dans l'éther de pétrole. Un autre échantillon de la solution protéique tamponné comme précédemment et agité mécaniquement est additionné lentement d'un poids d'isocyanate de phényle égal au poids de protéine en jeu. La vitesse d'addition est réglée pour que la totalité du réactif ait coulé au bout du temps prescrit. Dans les 2 cas, la protéine précipite peu à peu pendant l'opération, soit seule (cas du cétène) soit mélangée à de la diphényl-urée (cas de l'isocyanate de phényle).

Une fois ce traitement terminé, la liqueur est amenée à pH = 4,8 afin d'assurer la précipitation complète de la fraction protéique dénaturée puis elle est centrifugée. Le liquide clair est alors dialysé pendant 2 à 3 jours, quand il s'agit de doser les SH (car la plupart des tampons provoquent des précipitations au cours des dosages). Quand il s'agit par contre de doser les OH phénoliques, un simple repos de 30 min. de la solution est suffisant.

Au cours des acétylations par le cétène, le pH varie toujours malgré l'emploi de tampons concentrés. Nous avons voulu quelquefois opérer à pH constant et, dans ce but, nous avons ajouté progressivement de la soude au milieu réactionnel afin de garder le pH à la valeur convenable (pH = 5,6 : virage du rouge de méthyle ; pH = 7,5 : virage du rouge de phénol).

2° ACYLATIONS EN PRÉSENCE DE DODÉCYLSULFATE DE Na.

Ce détergent, qui possède la propriété de dénaturer les protéines en les maintenant à l'état dispersé, est également capable de les faire précipiter quand on change les conditions expérimentales (concentration, pH, présence d'électrolytes en particulier). Il peut d'ailleurs précipiter lui-même en présence de sels minéraux et se révéler ainsi incompatible avec certains tampons. Ce fait n'est pas très gênant pour les acylations par l'isocyanate de phényle mais, quand on veut acétyler au cétène, le milieu non-tamponné s'acidifie très rapidement. Nous avons alors trouvé qu'un tampon citrate M à pH = 6,4 ne provoque aucune précipitation et nous avons utilisé un tel tampon quand l'acidification du milieu est particulièrement néfaste, c'est-à-dire dans nos expériences sur les OH phénoliques.

Toutefois, ce tampon gêne le dosage colorimétrique de ces derniers groupes et il faut l'éliminer par dialyse.

Remarquons ici que les milieux contenant du dodécylsulfate peuvent, paraît-il, en être débarrassés selon Mirsky (28) en dialysant dans un appareil rotatif pendant 36 h. à 37°. Nous avons essayé ce procédé mais sans succès. C'est pourquoi, s'il s'avère impossible d'effectuer les dosages colorimétriques directement sur le liquide d'acylation, nous précipitons la protéine par addition d'un peu d'acétate de Na. Le coagulum est alors lavé abondamment et redissous au moment du dosage, soit dans le dodécylsulfate (dosage sans hydrolyse alcaline), soit dans la soude (dosage après hydrolyse alcaline).

3° ACYLATIONS STOECHIMÉTRIQUES.

Jusqu'ici, les protéines ont été généralement traitées par un très gros excès de cétène ou d'isocyanate de phényle et les progrès de l'acylation ont été suivis en fonction du temps. Cette manière de faire était d'ailleurs justifiée puisque les groupes protéiques étudiés (NH_2 , OH phénoliques) se combinent assez lentement à l'agent acylant pour que celui-ci soit en majeure partie hydrolysé. L'acylation des SH « réactifs » se présente, cependant, sous un jour différent puisqu'elle est presque instantanée. Il n'est donc pas interdit de chercher à la placer sur le plan stoechiométrique, c'est-à-dire à connaître le nombre de molécules de l'agent qu'il faut mettre en œuvre pour bloquer 1 SH « réactif ». Une telle étude a été effectuée sur les SH « réactifs » de l'albumine d'œuf dénaturée.

Un poids connu d'isocyanate est dissous dans l'acétone pure et parfaitement anhydre puis cette solution est ajoutée, lentement et en agitant bien, à une dispersion d'albumine dans le dodécylsulfate à 1,75 p. 100. Quant au cétène, on le fait barboter dans l'éther anhydre et privé de peroxydes par le sulfate ferreux. La teneur en cétène est déterminée sur une partie aliquote que l'on fait réagir soit avec un excès de soude M/100 soit avec une solution étherée d'aniline. Dans le premier cas, on titre en retour par SO_4H_2 M/100 en présence de phthaléine du phénol. Dans le second, on lave l'acétanilide par l'acide acétique dilué, on le sèche et on le pèse (*). La solution de cétène qui, rappelons-le, doit être absolument dépourvue de peroxydes, est alors ajoutée à la dispersion protéique comme indiqué plus haut. Le blocage des SH « réactifs » est suivi par la technique habituelle. Un essai-témoin nous a montré qu'il n'était pas nécessaire de conduire l'acylation sous azote car les SH « réactifs » ne s'autoxydent pas sensiblement pendant le traitement.

(*) On tient compte de la solubilité de l'acétanilide en partant d'un mélange connu de cette substance et d'aniline que l'on traite par les mêmes quantités d'éther et d'acide acétique que précédemment.

CHAPITRE III.

SORT DE L'HISTIDINE AU COURS DE L'ACÉTYLATION DES PROTÉINES PAR LE CÉTÈNE.

Nous avons déjà fait remarquer dans le chapitre I que le traitement des protéines au cétène pourrait bien provoquer la rupture de leurs noyaux imidazol. Neuberger suppose que cette rupture serait analogue à celle décrite par Bamberger. Si l'hypothèse de Neuberger est exacte, le cétène ne devrait pas attaquer le noyau imidazol de l'histidine libre mais serait capable de le détruire dans des protéines. Il nous a paru important de préciser ce point car les inactivations observées pendant l'action du cétène pourraient, dans certains cas, être provoquées par cette destruction.

Comme il s'agit d'une scission éventuelle du noyau imidazol, il semble indiqué de la suivre grâce à la réaction spécifique de ce noyau d'après Jorpes (63). Nous avons toutefois voulu confirmer nos résultats par la technique de Kappeler-Adler.

Ayant craint, d'autre part, que l'intensité des colorations formées par ces techniques soit influencée par l'acétylation du groupe aminé de l'histidine, ou même de son groupe iminé, nous avons pris soin, avant de procéder au dosage, de faire bouillir nos préparations d'histidine acétylée dans SO_4H_2 2N pendant 3 h. Un tel traitement fait baisser le pouvoir chromogène de l'histidine intacte de 10 p. 100 environ et nous avons tenu compte de cette baisse. Il n'est pas besoin évidemment de prévoir un traitement acide spécial pour les protéines puisque celles-ci sont de toutes façons longuement hydrolysées. Toutes les expériences témoins, concernant le dosage de quantités connues d'histidine dans des milieux d'acétylation ont en outre été effectuées.

Les protéines sont tout d'abord dialysées puis hydrolysées dans SO_4H_2 6N pendant 18 h. L'hydrolysat est ensuite neutralisé à la baryte et l'histidine est séparée par ionophorèse selon la technique classique.

Les résultats de ces études sont donnés, en ce qui concerne l'histidine, dans le tableau IV et, en ce qui concerne certaines protéines, dans le tableau V.

TABLEAU IV.

Action du cétène sur le noyau imidazol de l'histidine libre.

10 cm³ tampon acétate M (pH = 5,6). Sous l'influence du cétène ce pH baisse graduellement jusqu'à 4 environ.

Histidine mise en jeu (mg.)	Durée de l'acétylation (min.)	Histidine disparue p. 100
1	30	52
14	10	0
14	30	50
14	60	53
80	90	70
100	90	68

TABLEAU V.

Action du cétène sur les noyaux imidazol de quelques protéines.

Protéine		Volume total de l'essai (cm ³)	Durée de l'acétylation (h.)	N-histidine (p. 100 de N-protéique total)
Nature	Quantité (g.)			
Gélatine	1,5	150	0	0,63
—	—	—	1	0,64
Albumine d'œuf...	0,5	80	0	3,03
— — ...	1	—	2	2,87
Sérum albumine..	0,38	8	0	3,76
— — ..	0,34	8	2	3,66

Les deux tableaux IV et V suggèrent les quelques remarques suivantes :

1°) Le pouvoir chromogène de l'histidine vis-à-vis de l'acide diazo-sulfanilique (réactif de Jorpes) diminue notablement au cours du traitement par le cétène. Cette diminution ne semble pas être due à une acétylation dans le noyau ou dans la chaîne latérale, puisque nous avons pris soin d'hydrolyser tout groupement acétyle susceptible de s'être fixé en un point quelconque de la molécule. Il faut donc penser que l'on a affaire à une destruction lente du noyau imidazol.

Cette manière de voir est d'ailleurs confirmée par les expériences suivantes : on sait depuis Kossel que l'histidine est susceptible d'être précipitée de ses solutions par le nitrate d'argent en un milieu rendu faiblement alcalin (pH = 7,4) par la baryte. Quand cette technique, dont les détails ont été empruntés au travail de Tristram (64), est appliquée à des solutions d'histidine pure, on constate que l'histidine a en effet complètement précipité, c'est-à-dire que le liquide restant est dépourvu d'azote. Par contre, quand ce sont des solutions d'histidine traitées préalablement par le cétène puis l'acide sulfurique qui

sont mises en jeu, le liquide contient encore une quantité considérable d'azote mais donne une réponse très faible au test de Jorpes (Tableau VI). La séparation est conduite de la façon suivante :

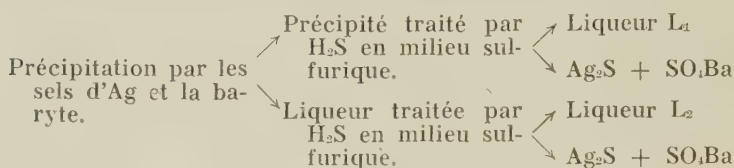


TABLEAU VI.

Répartition de l'azote et de l'histidine au cours de la séparation par les sels d'Ag.

83 mg. d'histidine dissous dans 10 cm³ de tampon acétate M à pH = 5,6 sont acylés 90 min. par le cétène puis hydrolysés 3 h. dans SO₄H₂ 2N.

Liquueur	N-total (p. 100)	N-histidine (p. 100)	N-non-histidine (p. 100)
L ₁	32	20,4	11,6
L ₂	65	8,4	56,6

Les chiffres du tableau VI montrent que 70 p. 100 de l'azote n'appartiennent plus à l'histidine. Il y a donc eu une profonde transformation.

On pourrait évidemment penser que l'azote non précipitable appartient à une diamine insaturée du type qui apparaît dans la scission de Bamberger. Il est connu en effet que la lysine, qui possède également une structure diaminée, ne précipite pas par les sels d'argent en milieu barytique. Toutefois, il nous est apparu que la majeure partie de cet azote était sous forme ammoniacale. Cet azote ammoniacal apparaît au cours de l'hydrolyse par SO₄H₂ 2N, probablement par désamination d'un produit intermédiaire de rupture. Ce fait nous a incité à ne pas chercher plus précisément la nature de la réaction provoquant la disparition du noyau imidazol.

2°) Nos résultats dans ce domaine semblent en contradiction avec ceux des auteurs qui ont préparé l'acétylhistidine en traitant l'histidine par le cétène. Toutefois, cette contradiction n'est qu'apparente car, d'une part, la destruction du noyau imidazol est lente, d'autre part, le rendement en acétylhistidine est assez mauvais et, enfin, la préparation de ce dernier corps se fait à pH alcalin tandis que nos expériences sont conduites à pH acide.

3°) Le tableau V montre que, contrairement à notre attente, les noyaux imidazol des protéines ne sont pas touchés par le cétène. La teneur en cet amino-acide des protéines traitées est en effet la même, aux erreurs d'expérience près, que celle des protéines initiales.

Deux hypothèses peuvent alors être émises : soit que la molécule protéique protège ses noyaux imidazol contre l'action du cétène, soit

que ces noyaux entrent dans certaines liaisons, par leurs groupes NH en particulier. Nous n'avons pas entrepris une étude systématique de ce problème, quoiqu'il présente un certain intérêt. L'état des noyaux imidazol dans les protéines est en effet encore assez mal connu. Un fait expérimental, maintes fois observé, est que la coloration donnée par les protéines avec le réactif de Jorpes est en général bien inférieure à celle que la teneur de ces protéines en histidine pourrait laisser prévoir. Il n'est pas interdit de penser que certains noyaux imidazol soient bloqués, par l'intermédiaire de leur NH par exemple, et que ce blocage les protège contre l'action destructive du cétène.

Quoi qu'il en soit, la stabilité des noyaux imidazol protéiques n'est pas due au masquage des fonctions —NH_2 et —COOH que l'on trouve dans l'histidine car l'ester méthylique de la carnosine voit, comme l'histidine, son noyau imidazol détruit par le cétène.

D'ailleurs, le seul point qui nous intéresse ici directement est que l'inactivation des protéines par le cétène ne peut pas provenir de la destruction de leurs noyaux imidazol. De plus, la rupture que l'on observe sur le noyau imidazol de l'histidine n'est très probablement pas du type « Bamberger ».

CHAPITRE IV.

ACYLATION DES GROUPES SH PROTÉIQUES ET SON APPLICATION A L'ÉTUDE DE L'URÉASE

PARAGRAPHE I.

Etude de l'acylation des groupes thiol dans l'albumine d'œuf et la kératine

A. — HYDROLYSE ALCALINE DES LIAISONS S-ACYLÉES.

Au cours de nos expériences, nous observons fréquemment que la teneur en SH libres des protéines acylées est plus faible que celle des protéines initiales. Sommes-nous en présence d'une réelle acylation de ces groupements ou d'une simple oxydation ? Pour fixer ce point, nous avons, comme Fraenkel-Conrat (3), cherché à tirer profit de l'instabilité en milieu alcalin des liaisons S-acylées susceptibles de s'être formées.

Signalons ici que, dans la plupart des cas, l'auteur américain semble pouvoir faire réapparaître quantitativement les SH de ses préparations d'albumine acylée en les maintenant quelques minutes dans de la soude diluée. Le temps pendant lequel il convient d'hydrolyser n'est d'ailleurs pas indiqué car il varie, paraît-il, suivant les cas.

Nous n'avons pas été constamment aussi heureux que Fraenkel-Conrat et nous décrivons ci-après les divers essais que nous avons été amenés à entreprendre.

a) Sur le coagulum d'albumine d'œuf précité en cours d'acylation.

Un coagulum, provenant de 40 mg de protéine acétylée pendant 45 min., est lavé puis dissous dans 3 cm³ de NaOH 2N. La solution est laissée sous atmosphère d'azote pendant un temps variable puis elle est neutralisée par SO₄H₂ 2N. Le précipité est recueilli, lavé et dissous dans le dodécylsulfate à 10 p. 100. Le dosage des SH est alors conduit comme d'habitude sur une partie aliquote (Méthode I). Dans certaines expériences, nous sommes partis d'une plus faible quantité de coagulum que nous avons dissous dans 1,5 cm³ de NaOH N. Après centrifugation, la liqueur est neutralisée par HCl N et, dans le mé-

lange même, on ajoute le dodécylsulfate et les divers réactifs du dosage (Méthode II).

b) *Sur des solutions d'albumine acylée ou des solutions de kératine dans un tampon phosphate.*

Dans 1 cm³ de solution contenant 15 à 20 mg de protéine, on ajoute 0,75 cm³ de NaOH N et on laisse 10 min. sous une atmosphère d'azote. Puis on neutralise par HCl N et on continue le dosage (Méthode III).

Remarquons ici que le traitement à la soude des protéines en présence de dodécylsulfate provoque toujours la disparition d'une partie notable des SH.

Le tableau VII résume les résultats obtenus sur des échantillons d'albumine acylée par l'application des 3 méthodes décrites ci-dessus :

TABLEAU VII.

Hydrolyse alcaline des liaisons S-acylées dans l'albumine d'œuf.

Matériel mis en œuvre	Méthode utilisée	Durée de l'hydrolyse (min.)	“ -SH ” en p. 100 des “ -SH ” initiaux	
			Avant hydrolyse	Après hydrolyse
Coagulum d'albumine acétylée	I	2	0	26
		5	0	32
		15	0	39
		30	0	43
Coagulum d'albumine	II	4	0	73
		10	0	75
Solution d'albumine traitée au cétène	III	10	67	93
Solution d'albumine traitée à l'isocyanate de phényle.	III	10	45	100

Comme le montrent les chiffres du tableau VII, la réapparition des SH au cours de l'hydrolyse alcaline n'est pas toujours quantitative. Nous attribuons ce fait, soit à une oxydation partielle, soit à une destruction par l'alcali. Quoi qu'il en soit, dans les expériences qui vont être décrites, le rendement de cette réapparition a toujours été assez bon pour nous prouver que la disparition des SH protéiques constatée au cours de nos expériences est due, en grande partie tout au moins, à leur masquage par acylation.

B. — ACYLATION DE L'ALBUMINE NATIVE.

Dans une 1^{re} série d'expériences, l'albumine est mise dans un tampon acétate M/2 (pH = 5,6) ou dans un tampon phosphate M/2 (pH = 7,5). Aucune autre précaution n'est prise pour assurer la constance du pH pendant le traitement. Dans ces conditions, le pH des

essais avec l'isocyanate de phényle ne varie pas sensiblement. Par contre, le cétène fait baisser considérablement le pH jusqu'à une valeur de 4 environ.

Dans une 2^e série d'expériences, nous avons cherché, comme il est indiqué au chapitre III, à maintenir le pH constant pendant l'acétylation au cétène.

De toutes façons, le coagulum de protéine est ensuite éliminé par centrifugation, le liquide clair est dialysé pendant 2-3 jours et centrifugé à nouveau. On détermine alors par Kjeldahl la quantité de protéine restée en solution et la teneur en SH et NH₂ libres est trouvée par les méthodes déjà connues (Tableau VIII).

TABLEAU VIII.

Acylation des SH de l'albumine native.

Comme nos préparations d'albumine ne présentent pas toutes la même teneur en « —SH », nous avons toujours rapporté nos résultats à une teneur uniforme de 1,0 p. 100. L'acylation des NH₂ est donnée à titre de comparaison.

pH	Nature de l'agent acylant	Temps d'action (min.)	“ -SH ” (p. 100)		N-NH ₂ (en p. 100 de N-protéique total)
			Avant hydrolyse alcaline	Après hydrolyse alcaline	
5,6—4	cétène	15	1,00	—	—
—	—	20	1,00	—	0,94
—	—	240	1,00	—	—
—	—	270	1,00	—	—
5,6—5,2	—	30	0,84	0,94	—
7,5—7,2	—	15	1,00	—	1,23
5,6	cétène	30	0,90	0,94	—
7,5	—	30	0,67	0,92	—
5,6	isocyanate de phényle	45	0,85	—	—
—	—	90	0,60	—	3,9
—	—	180	0,42	0,78	3,9
7,5	—	90	0,48	1,00	1,2

L'examen des chiffres du tableau VIII provoque les quelques remarques suivantes :

1°) Le cétène et l'isocyanate de phényle ont une très faible affinité pour les SH « non réactifs » de l'albumine native. Cette affinité apparaît presque nulle dans le cas du cétène quand on laisse le milieu s'acidifier. Par contre, on note, avec cette même substance, une lente acétylation quand on maintient le pH à 5,6 ou au dessus.

2°) L'acylation des groupes aminés par le cétène ou l'isocyanate de phényle est fonction du pH : elle est légèrement plus rapide à pH = 7,5 qu'à pH = 5,6.

C. — ACYLATION DE L'ALBUMINE DÉNATURÉE.

1. — *Par un excès indéterminé d'agent acylant.*

Les expériences précédentes nous montrent donc que les SH de l'albumine native s'acylent avec grande difficulté. Toutefois, des expériences d'orientation nous ont vite montré que ces SH, une fois rendus « réactifs » par la dénaturation, s'acylent au contraire très rapidement. Nous avons déjà fait remarquer que l'albumine précipite graduellement pendant les traitements d'acylation. Le coagulum peut alors être recueilli et dispersé dans le dodécylsulfate de Na. On s'aperçoit facilement qu'il ne contient plus de SH libres. Nous avons voulu confirmer cette observation en acylant une albumine déjà dénaturée, au moment même de l'acylation, par dispersion dans le dodécylsulfate à 1,75 p. 100. Comme nous l'avons fait déjà remarquer, on est obligé dans ces conditions de laisser le milieu s'acidifier spontanément car le détergent est incompatible avec la plupart des tampons (Tableau IX).

TABLEAU IX.

Acylation des SH de l'albumine dénaturée.

Etat de la protéine	pH	Nature de l'agent acylant	Temps d'action (min.)	"-SH" (p. 100)		N-NH ₂ (p. 100 de N-pro- téique total)
				Avant hydrolyse alcaline	Après hydrolyse alcaline	
Précipitée en cours d'acylation	5,6	cétène	25	0,00	—	—
	—	—	45	0,00	0,73	—
	—	isocyanate	300	0,00	—	—
En dispersion dans le dodécylsulfate pendant l'acyla- tion	5-4	cétène	1	0,15	—	3,9
	—	—	5	0,00	0,62	—
	5-4	—	10	0,00	—	3,5
	5	isocyanate	1	0,00	—	—
	—	—	15	0,00	—	3,95

Le tableau IX nous permet de faire les observations suivantes :

1°) Contrastant de façon tout à fait nette avec l'acylation des SH de l'albumine native, celle des SH de la protéine dénaturée est extrêmement rapide. Nous avons bien affaire ici à une réelle acylation car les SH réapparaissent en grande partie par hydrolyse alcaline. Le rendement de cette réapparition pourrait sembler assez faible mais on ne doit pas oublier que les détergents inhibent l'hydrolyse alcaline des liaisons acyle (35).

2°) Il est extrêmement curieux de constater que l'aptitude à l'acylation des SH de l'albumine dénaturée est plus grande que celle des SH appartenant à des mercaptans à bas poids moléculaire comme le glutathion et la cystéine (2).

3°) Une des caractéristiques importantes de cette acylation est qu'elle se produit à grande vitesse en milieu acide. Semblable obser-

vation avait déjà été faite par Fraenkel-Conrat (3) pour l'acylation des SH de l'albumine native. Mais il faut rappeler que nos expériences n'ont pas entièrement confirmé ce point. Nous trouvons que, si les SH de l'albumine native ne s'acylent de façon notable qu'à $\text{pH} = 5,6$ et au dessus, les SH de l'albumine dénaturée s'acylent presque instantanément en milieu acide ou alcalin. L'augmentation de « réactivité » des SH vis-à-vis des agents acylants semblent donc élargir le domaine de pH dans lequel l'acylation peut se faire.

4°) Le fait que cette acylation puisse avoir lieu en milieu acide présente un gros intérêt : Les autres groupements protéiques (comme les NH_2 ou les OH phénoliques) s'acylent en effet très mal dans ces conditions. Jointe au fait que l'acylation des SH est très rapide, cette observation laisse prévoir que l'on pourra acyler tout à fait sélectivement les SH « réactifs » d'une protéine.

5°) Il faut noter que l'on a quelquefois de la peine à redissoudre dans le dodécylsulfate l'albumine d'œuf qui a précipité pendant l'acylation. Les dosages dont il est fait mention plus haut se rapportent donc seulement à la fraction que l'on peut solubiliser. Ce fait ne nous paraît pas affecter la validité de nos conclusions car la fraction la plus soluble est probablement la moins acylée. Quand, donc, on trouve que cette fraction ne possède plus de SH libres, on doit penser que, a fortiori, l'échantillon total en est également dépourvu.

2. — *Par des quantités connues d'agent acylant.*

Les expériences précédentes montrent que les SH de l'albumine dénaturée sont acylés très rapidement. Ils présentent donc une affinité extrême pour les agents acylants mis en œuvre (cétène ou isocyanate de phényle). Ces agents, que l'on met ainsi au contact d'une dispersion ou d'une suspension aqueuse de protéine dénaturée, vont donc se trouver en présence de deux destins principaux qui entreront en compétition : l'union avec l'eau, d'une part, et l'union avec les SH de la protéine, d'autre part. Il est alors intéressant de connaître le nombre de mols. du réactif acylant qui sont nécessaires pour masquer 1 SH. Si ce nombre est peu différent de 1, l'acylation des SH pourra être placée sur une base stoechiométrique qui en augmenterait beaucoup l'intérêt.

Afin de fixer ce point, nous avons préparé des solutions titrées (voir chapitre III) de cetène dans l'éther sans peroxydes et d'isocyanate de phényle dans l'acétone. Nous avons fait agir des volumes connus de ces solutions sur des dispersions d'albumine dans le dodécylsulfate et nous avons dosé les SH comme d'habitude (Tableau X).

Les résultats de ce tableau sont également reportés sous forme graphique dans la figure I.

Il ressort clairement de l'examen du tableau X et de la figure I que l'action de l'isocyanate de phényle se porte presque exclusivement sur les SH de la protéine. On peut en effet bloquer totalement ces derniers par 1,16 fois la quantité théorique du réactif. Nous pensons que les 0,16 mol. restantes entrent en combinaison avec l'eau. Il n'y aurait donc aucun autre groupe touché. Par contre, 30 fois la quantité théorique de cetène ne provoque que 64 p. 100 d'acétylation seu-

lement. Ce fait provient-il d'une affinité plus grande du cétène pour les molécules d'eau ou trouve-t-il son origine dans une affinité plus grande de l'isocyanate pour les SH protéiques ? La question mériterait évidemment d'être discutée. Mais le point qui nous intéresse ici plus immédiatement est le suivant : Quand on se trouve en pré-

TABLEAU X.

Acylation des SH de l'albumine dénaturée avec des quantités connues de cétène et d'isocyanate de phényle.

Quantité d'albumine mise en jeu (mg.) (1)	Milliéquivalents SH (2)	Agent acylant		Rapport (2)/(4) (5)	Acylation (p. 100) (6)
		Nature (3)	Millimol. utilisées (4)		
140	0,0116	isocyanate	0,0116	1	76
140	0,0116	—	0,0134	1,16	100
140	0,0116	—	0,0232	2	100
71	0,0061	cétène	0,0118	1,94	19,5
56	0,0045	—	0,0207	4,6	31,5
140	0,0116	—	0,132	11,4	52,4
89	0,0077	—	0,230	30	63,7

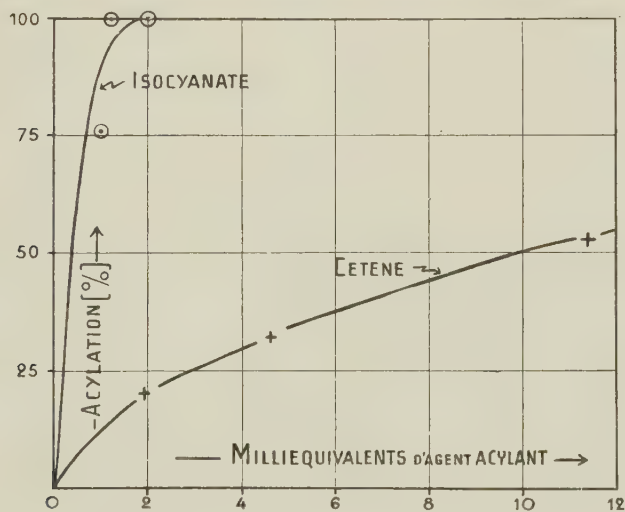


FIG. I. — Acylation des SH de l'albumine dénaturée avec des quantités connues de cétène et d'isocyanate de phényle.

sence d'une protéine possédant des SH aussi « réactifs » que ceux de l'albumine en dispersion dans le dodécylsulfate, on peut bloquer sélectivement ses SH en faisant agir 1,16 fois la quantité d'isocyanate en solution acétonique sur la protéine placée en milieu faiblement acide.

D. — ACYLATION DE LA KÉRATÉINE.

Les expériences que nous venons de décrire ont porté sur l'albumine d'œuf coagulée ou dispersée dans un détergent. Dans les deux cas, les SH « réactifs » sont acylés très rapidement. Il est alors intéressant de suivre le comportement des SH protéiques qui sont « réactifs » avant tout traitement. Parmi les protéines qui possèdent de tels SH, nous avons choisi la kératine comme matériel d'étude, par suite de la facilité avec laquelle on peut en préparer de larges quantités. Cette protéine représente de la kératine réduite par CNK. Un certain nombre de ponts disulfure, présents dans cette dernière, apparaissent alors dans la kératine sous forme de SH « réactifs ».

150 mg de cette kératine, préparée comme il est dit plus haut, sont mis en suspension dans 5 cm³ de tampon acétate M (pH = 5,6) et acétylés par barbotage de cétène.

Les résultats, tout à fait analogues à ceux de l'albumine dénaturée (Tableau IX), sont donnés dans le tableau XI.

TABLEAU XI.

Acétylation des SH de la kératine.

Toutes les acétylations ont été conduites à un pH variant entre 5,6 et 4,6.

Temps d'acétylation (min.)	" -SH " (p. 100)	
	Avant hydrolyse alcaline	Après hydrolyse alcaline
0	1,20	—
1	0,29	1,14
2	0,26	1,24
5	0,00	0,81

On voit donc que, même en l'absence de dodécylsulfate, les SH protéiques peuvent s'acyler très rapidement, pourvu qu'ils soient suffisamment « réactifs » au départ.

PARAGRAPHE II.

Inactivation de l'uréase par l'isocyanate de phényle

A. — GÉNÉRALITÉS.

Les résultats du paragraphe précédent nous montrent que les agents d'acylation peuvent distinguer, de façon tout à fait sélective, entre SH « réactifs » du type albumine dénaturée ou kératine et les SH « non réactifs » du type albumine d'œuf native. En effet :

a) Quand on utilise un large excès d'agent acylant, les 1^{er} sont acylés instantanément tandis que les 2^e réclament un très long délai.

b) Quand on utilise des quantités faibles et connues d'isocyanate de phényle, les 1^{er} sont complètement bloqués par une quantité de l'agent acylant peu différente de la quantité théorique, tandis que les 2^e nécessitent une quantité beaucoup plus forte.

L'exemple de l'uréase (Voir chapitre I, paragraphe III), nous a paru particulièrement bien choisi pour tester nos agents d'acylation. Si ce que dit Hellerman est exact, 1,16 mol. d'isocyanate de phényle, agissant sur 21.300 g. d'uréase, doit faire disparaître tous les SH « réactifs » et laisser l'activité inchangée. Plus de 1,16 mol. de l'agent doit faire disparaître d'autres SH et faire diminuer l'activité.

B. — CARACTÉRISTIQUES DE LA PRÉPARATION D'URÉASE UTILISÉE.

Les préparations d'uréase obtenues par la technique qui vient d'être décrite possèdent, nous l'avons vu, une pureté comprise entre 32.000 et 35.000 *U.g.* Leur teneur réelle en enzyme est calculée en admettant que 1 g d'uréase pure développe une activité de 130.000 *U.* Les SH « réactifs » et totaux ont été trouvés correspondre, respectivement, à 0,58 et 2,75 g de cystéine pour 100 g d'enzyme.

Le chiffre de 0,58 p. 100 semble en bon accord avec celui des autres auteurs puisqu'il indique la présence de 1,02 groupe thiol dans 21.300 g. d'enzyme. Il est cependant trop fort car, par suite sans doute d'une mauvaise précipitation tungstique de l'uréase ou de l'une des protéines qui l'accompagnent, la liqueur soumise au dosage colorimétrique présente un trouble assez notable. Nous pensons donc que nos préparations enzymatiques ont subi une légère autoxydation qui, d'ailleurs, n'influe pas sur leur activité. Si cette hypothèse est exacte, il conviendrait alors de relever quelque peu le chiffre de 2,75 p. 100 trouvé pour les SH totaux. Une teneur initiale de 2,85 p. 100, correspondant à 5 SH par subunité d'uréase, a donc été adoptée.

C. — INFLUENCE DE L'ACYLATION SUR L'ACTIVITÉ DE L'URÉASE.

Nous avons renoncé dès l'abord à étudier l'acétylation de l'uréase par le cétène pour les 2 raisons principales suivantes :

a) L'emploi de cet agent dans des expériences stoechiométriques est impossible.

b) Cet agent tendant à acidifier le milieu, il faut opérer en présence de tampons concentrés qui doivent être ensuite éliminés par dialyse avant de procéder au dosage des SH. Or, la dialyse d'un ferment aussi sensible que l'uréase à des traces de métaux lourds, est une opération fort délicate. Il nous est apparu qu'il serait impossible de distinguer entre l'inactivation due à la dialyse et l'inactivation provoquée réellement par l'acétylation. Nous nous sommes donc limités à l'isocyanate de phényle que nous avons fait réagir, comme précédemment décrit, soit en gros excès, soit en quantités faibles et bien connues.

La 1^{re} expérience a été réalisée comme suit : 1,57 mg d'uréase de faible pureté, contenus dans 5 cm³ d'eau, sont traités sous agitation par des quantités croissantes d'isocyanate. Des échantillons sont prélevés et centrifugés. Leur activité est mesurée par le test habituel (Tableau XII).

TABLEAU XII.

Acylation par un excès d'isocyanate d'une préparation uréasique de faible pureté.

Durée de l'acylation (min.)	Quantité (mg.) d'isocyanate	Inactivation (p. 100)
40	3	7
70	5,25	20
150	12	29
220	16	48

Les chiffres du Tableau XII montrent que, au cours de l'acylation, l'activité du liquide diminue progressivement. Cette diminution est d'ailleurs fort lente. On est donc déjà amené à penser que l'acylation des SH « réactifs » qui, elle, est certainement rapide, n'entraîne pas l'inactivation. Toutefois, notre expérience présente de multiples défauts :

1°) La préparation uréasique est impure et l'on sait qu'il est beaucoup plus difficile d'inactiver l'uréase quand elle est accompagnée de substances étrangères.

2°) L'excès d'isocyanate se transforme en diphénylurée qui précipite. On peut craindre que ce précipité entraîne de l'uréase et que l'inactivation observée résulte de cet entraînement.

3°) Aucun dosage de SH n'a été fait et l'on ignore le sort réel de ces SH pendant le traitement.

Quoi qu'il en soit, nous avons cherché à savoir si, par traitement alcalin, on pourrait obtenir une réactivation. L'uréase inactivée à 48 p. 100 a été maintenue en milieu alcalin pendant 10 min. sous azote. Son activité est restée la même pendant le traitement. Par contre, une uréase non acétylée, traitée dans les mêmes conditions, voit son activité baisser de 43 p. 100.

Dans une 2^e expérience, nous avons alors acylé une uréase beaucoup plus pure (pureté : 35.000 U.g.) avec des quantités connues d'isocyanate en solution acétonique. L'acétone ne provoque certainement pas

d'inactivation par elle-même puisque le ferment est préparé en présence de grandes quantités de ce solvant.

15,8 mg d'uréase contenus dans 2,85 cm³ de solution ont été traités par des volumes connus de solution acétonique d'isocyanate et des échantillons ont été prélevés avant chaque addition. Les quantités d'isocyanate sont assez faibles pour qu'il n'y ait aucune précipitation de diphenylurée. Sur chaque échantillon, on dose l'activité et les SH totaux (Tableau XIII).

TABLEAU XIII.

Inactivation de l'uréase hautement purifiée.

N° de l'essai	Durée de l'acylation (min.)	Equivalents isocyanate (cal. par rapport aux SH (a))	“SH” pour 100 g. d'uréase		Nombre de groupes SH (par 21.300 g. d'uréase)		Activité p. 100
			des préparations	Disparus	des préparations	Disparus	
1	0	0,00	2,85	0,00	5,0	0,0	100
2	10	2,25	2,3	0,55	4,0	1,0	97,5
3	20	10,7	2,3	0,55	4,0	1,0	75,5
4	35	17,8	—	—	—	—	58,6
5	65	31,5	2,1	0,75	3,7	1,3	37,0
6	82	39,0	2,07	0,78	3,65	1,35	25,0

Les résultats du tableau XIII sont donnés sous forme graphique dans les figures II et III.

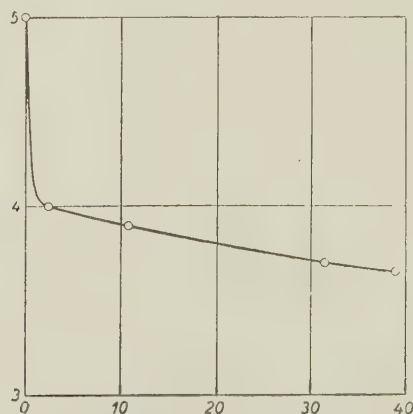


FIG. II. — Variation du nombre de groupes thiol de l'uréase pendant l'acylation.

En abscisses : Nombre d'équivalents isocyanate ajoutés (calculés par rapport aux —SH (a) de l'uréase).

En ordonnées : Nombre de groupes —SH totaux dans 21.300 g. d'uréase.

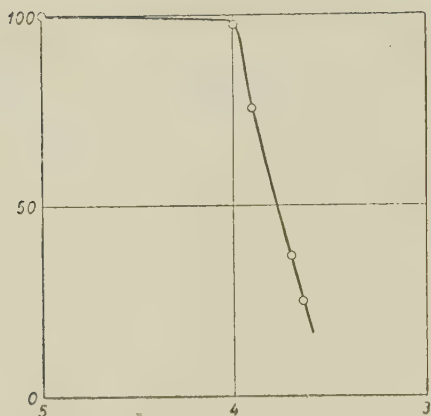


FIG. III. — Activité de l'uréase en fonction de sa teneur en —SH totaux.
 En abscisses : Nombre de groupes —SH totaux dans 21.300 g. d'uréase.
 En ordonnées : Activité p. 100 (l'activité initiale est prise comme base 100).

Ces figures et le tableau suggèrent ce qui suit :

1. Dès que l'on traite la solution d'uréase par l'isocyanate, certains SH disparaissent rapidement (Fig. 2). C'est ainsi que 2,25 équivalents de l'agent acylant bloquent 1 SH sur 5. Nous assistons, de toute évidence, à l'acylation des SH (a) selon HELLERMAN qui, étant « réactifs », se combinent presque stoechiométriquement à l'isocyanate.

2. Si l'on poursuit l'addition d'isocyanate, la teneur en SH totaux baisse beaucoup moins vite (fig. 2). Il faut en effet à ce moment 29 équivalents d'isocyanate pour faire disparaître 0,3 SH, donc près de 50 fois plus qu'auparavant. Les groupes SH qui sont alors bloqués sont ainsi nettement moins « réactifs » que les précédents.

3. Au cours de cette deuxième phase, le ferment s'inactive brusquement (fig. 3). Il ne paraît pas probable que l'excès d'isocyanate agisse sur d'autres groupes que les SH car, en milieu non-tamponné et légèrement acide, les groupes NH_2 et OH phénoliques s'acylent très lentement, même quand ils se trouvent en présence de quantités considérables d'agent acylant. Dans notre cas, ces phénomènes parasites sont donc certainement négligeables et l'action de l'isocyanate sur les groupes SH « non-réactifs » semble bien être la cause déterminante de l'inactivation.

4. La courbe de la fig. 3 met nettement en évidence cette chute d'activité uréolytique dès que les SH « non-réactifs » commencent à s'acyler. Cette courbe, il ne nous a malheureusement pas été possible de la tracer jusqu'à disparition totale de l'activité enzymatique. Sa pente, toutefois, est tellement accusée qu'elle suggère que l'inactivation totale est atteinte bien avant que le deuxième SH soit complètement bloqué. Nos essais conduisent donc, sur ce point, à des résultats un peu différents de ceux d'Hellerman car ils ne font pas apparaître de façon aussi nette la nécessité de distinguer, parmi les SH « non-réactifs »

de l'uréase, des groupes (b) particuliers et de leur conférer une importance physiologique spéciale. Ce désaccord s'explique d'ailleurs aisément si l'on admet (voir l'introduction) que le p-chloromercurobenzoate ne se combine pas stoechiométriquement aux SH non-réactifs.

Dans ces conditions, le travail d'Hellerman n'indiquerait qu'une chose : c'est que le 2° équivalent du dérivé mercurique provoque, dans la molécule d'uréase et au niveau de ses —SH « non-réactifs », des transformations de degré indéterminé, entraînant l'inactivation.

6°) Il est intéressant de rapprocher ces résultats du travail tout récent de Bailey (66) concernant le rôle des SH dans l'activité A.T. Pase de la myosine et son aptitude à former de l'actomyosine. Cet auteur, comme nous-même, trace des courbes d'activité en fonction de la teneur en SH de la myosine. Il trouve alors que l'inactivation de la myosine débute très vite dès que les premiers SH ont disparu. Ces résultats sont d'ailleurs en contradiction évidente avec ceux de Singer et Barron (67) qui semblent montrer que l'activité de la myosine, comme celle de l'uréase, n'est pas influencée par le blocage de ses SH les plus « réactifs ». Si donc, ce sont les résultats de Bailey qui sont exacts, l'inactivation de la myosine par blocage de ses SH suit un cours bien différent de celle de l'uréase. Au contraire, si les conclusions de Singer sont justifiées, un parallélisme frappant apparaît entre les 2 ferments.

7°) Quoi qu'il en soit d'ailleurs, un fait fondamental semble bien acquis : l'uréase perd son activité au moment où l'on commence à bloquer ses SH « non-réactifs ». Il faut alors noter que cette « non-réactivité » provient soit de l'existence, au sein de l'uréase native, de liaisons structurales labiles dans lesquelles les groupes se trouvent impliqués, soit d'un empêchement stérique quelconque. Dans les deux cas, il paraît difficile de croire que ces groupes « non-réactifs » puissent jouer par eux-mêmes un rôle précis dans l'activité enzymatique, en facilitant, par exemple, la formation du complexe enzyme substrat.

Mais, dans les deux cas également, la protéine native subit certainement des modifications de structure avant que les groupes « non-réactifs » puissent être bloqués par la substance chimique mise en œuvre. Peut-être ces modifications qui se produisent soit au moment de la rupture des liaisons labiles éventuelles soit au moment où la substance chimique fraye son chemin jusqu'aux groupes difficilement accessibles, sont-elles de nature à entraîner la perte de l'activité. Si cette hypothèse est exacte, le blocage des groupes aurait un caractère secondaire et le phénomène réellement important consisterait en une série de dénaturations partielles intervenant au niveau de ces groupes. Rien n'empêche de croire que les dénaturations soient suffisamment localisées, du moins dans leurs premiers stades, pour être réversibles.

Nous pensons que cette hypothèse devrait être envisagée *toutes les fois que l'activité physiologique d'une protéine semble dépendre de l'intégrité de l'un de ses groupes « non-réactifs »*.

CHAPITRE V.

SUR L'ACETYLATION DES GROUPES PHENOL PROTEIQUES

Dans le chapitre précédent, nous avons montré que la vitesse d'acylation des groupes thiol protéiques varie considérablement suivant leur état de « réactivité ». Presque instantanée dans l'albumine d'œuf dénaturée et la kératine, cette acylation est extrêmement lente dans l'albumine native. Il nous a paru intéressant de savoir si un phénomène analogue pouvait être retrouvé avec d'autres groupes. Ce sont les OH phénoliques qui ont plus particulièrement retenu notre attention car l'on sait déjà que, à l'instar des groupes thiol, leur « réactivité » au sein de certaines protéines n'est pas la même que dans les dérivés simples de la tyrosine. Cette « réactivité », de plus, semble varier notablement selon la protéine à laquelle on s'adresse et son degré de dénaturation.

Comme nous l'avons vu dans ce chapitre, les renseignements déjà connus, concernant la « réactivité » des OH phénoliques vis-à-vis des agents d'acylation sont encore extrêmement vagues. Nous avons donc entrepris cette étude en nous servant du cétène comme agent d'acylation, d'une part, de la glycytyrosine, de l'albumine d'œuf native et dénaturée et enfin de l'insuline comme molécule porteur d'OH phénoliques, d'autre part.

PARAGRAPHE I.

Eléments d'appréciation déjà connus

Nous avons déjà fait remarquer que les études entreprises jusqu'ici sur l'acylation des groupes thiol-protéiques ont été réalisées dans des conditions expérimentales extrêmement variées. C'est qu'en effet, le but immédiat des chercheurs était uniquement de connaître l'influence de cette acylation sur l'activité physiologique de leurs protéines. Les conditions choisies ont donc été celles qui paraissaient les plus commodés a priori. De plus, la plupart de ces études ont été entreprises par des gens qui avaient subi fortement l'influence du travail de Herriott sur la pepsine. Les acylations ont donc presque toujours été réalisées en milieu acide. Les OH phénoliques s'acylent alors très lentement et les différences éventuelles que l'on pourrait constater dans leur aptitude à s'acyler, sont faibles. Quoi qu'il en soit nous avons sélectionné et rassemblé dans le tableau XIV les renseignements déjà connus qui paraissent se prêter le mieux à une comparaison.

TABLEAU XIV.

Quelques renseignements déjà connus concernant l'acétylation par le cétène à pH 5,6 des groupes phénol de la glycylytyrosine, de l'ovalbumine native et de l'insuline.

Durée de l'acétylation (min.)	P. 100 de tyrosine acétylée dans la			
	Glycylytyrosine (6)	Pepsine (5)	Insuline (18)	Ovalbumine (3)
5	—	—	4	—
10	—	—	11	—
30	20	—	—	—
45	—	4	—	0(*)
60	39	—	—	—
180	79	—	—	—
720	—	12	—	—
1080	—	—	87	—
2100	—	32	—	—

(*) La durée exacte de l'acylation ne ressort pas clairement de ce travail.

Le tableau XIV montre déjà des différences assez sensibles : un 1^{er} groupe composé de la glycylytyrosine et de l'insuline où les OH semblent s'acétyler assez vite, un 2^e groupe comprenant la pepsine et l'albumine d'œuf où ces mêmes OH s'acétylent par contre très lentement, les OH de l'albumine d'œuf paraissant encore plus « inertes » que ceux de la pepsine.

PARAGRAPHE II.

Comparaison à divers pH de la vitesse d'acétylation des —OH phénoliques appartenant à la glycytyrosine, l'albumine d'œuf native et l'insuline

On traite par le cétène (2 bulles/sec. Temp. 20-25°) soit une solution à 0,45 p. 100 de glycytyrosine (Hoffmann-La Roche), soit une solution de 3,1 p. 100 d'albumine d'œuf cristallisée, soit enfin, une suspension de 200 mg d'insuline pure (Boots) dans 5 cm³ de liquide. Les tampons utilisés sont des mélanges acide acétique-acétate M (pH = 5,6) ou phosphates M/4 (pH = 7,5). Le pH est rigoureusement maintenu à sa valeur de départ (rouge de méthyle pour le pH = 5,6 ; rouge de phénol pour le pH = 7,5) par addition ménagée de soude. Au bout du temps prescrit, l'albumine qui a précipité pendant l'acétylation, est éliminée par centrifugation. Quant à l'insuline, peu soluble dans les tampons utilisés, elle est centrifugée après traitement, lavée à l'acétone et à l'éther puis dissoute dans l'eau.

Les diverses techniques décrites dans le chapitre précédent sont alors appliquées aux liqueurs obtenues et les résultats qu'elles donnent sont reportés dans le tableau XV.

TABLEAU XV.

*Aptitude à l'acétylation des groupes phénol de la glycytyrosine,
de l'albumine native et de l'insuline.*

pH	Durée de l'acétylation (min.)	P. 100 de tyrosine acétylée		
		Glycytyrosine	Albumine native	Insuline
7 5	5	35	—	20
7 5	10	—	—	—
7,5	15	96	40	—
7 5	45	—	65	—
5,6	10	50	5	—
5,6	15	—	—	25
5,6	20	94	—	—
5,6	25	—	10	—

Les chiffres du tableau XV appellent les quelques remarques suivantes :

1. Dans nos expériences, l'acétylation des OH phénoliques de la glycytyrosine et des protéines progresse nettement plus vite que l'on a

coutume de le signaler. Voici un exemple frappant : D'après Herriott, la glycylytyrosine s'acétyle à 20 p. 100 pendant 30 min. à pH 5,6. Nous trouvons 94 p. 100 d'acétylation en 20 min. dans les mêmes conditions. Le débit du cétène est probablement plus rapide dans nos expériences. Mais il ne faut pas oublier que la vitesse d'acétylation des groupes phénol est extrêmement sensible aux variations de pH. Au-dessous de pH = 5 en particulier, elle devient presque nulle. Peut-être avons-nous simplement maintenu notre pH avec plus de soin qu'on ne l'avait fait jusqu'ici.

2. Comme on pouvait s'y attendre, les groupes phénol s'acétylent mieux, quelle que soit la molécule qui les portent, à pH = 7,5 qu'à pH = 5,6. Ce fait traduit simplement la mobilité plus grande de l'hydrogène phénolique en milieu alcalin.

Quand il s'agit donc de déterminer les répercussions qu'exerce l'acétylation des groupes phénol sur l'activité physiologique des protéines, on a intérêt à travailler en milieu légèrement alcalin chaque fois que la stabilité de la protéine le permet.

3. Les groupes phénol de la glycylytyrosine s'acétylent toujours notablement plus vite que ceux des deux protéines étudiées. Toutefois, l'acétylation est beaucoup plus aisée dans l'insuline que dans l'albumine d'œuf native. Nos résultats confirment ceux de Crammer et Neuberger en ce qui concerne tout au moins les différences entre insuline et albumine native. Dans cette dernière protéine, l'hydrogène phénolique présente bien une mobilité remarquablement faible. Mais cette mobilité ne semble pas être à son maximum dans l'insuline elle-même.

PARAGRAPHE III.

Essai de comparaison entre l'acétylation des OH phénoliques de l'albumine d'œuf native et dénaturée

Il convient maintenant de se demander ce que devient, au moment de la dénaturation, l'aptitude à l'acétylation des groupes phénol de l'albumine. Va-t-elle, par un processus aussi spectaculaire que celui noté sur les groupes thiol, rejoindre ou même dépasser celle des phénols simples ? Va-t-elle tout au moins être portée au même niveau que celle des groupes de l'insuline ? Pour fixer ce point, deux techniques expérimentales, analogues à celles déjà utilisées au cours de notre première étude, peuvent alors être envisagées : a) soit recueillir le coagulum dénaturé qui se forme quand on acétyle des solutions aqueuses d'albumine, le disperser dans le dodécylsulfate et appliquer les techniques de Miller à cette dispersion ; b) soit faire agir directement le cétène sur une solution d'albumine dans le dodécylsulfate et noter la diminution que subit le pouvoir chromogène du milieu au cours du traitement. Toutefois, en dehors des erreurs provoquées par les liaisons S-acétyle, erreurs dont nous avons déjà discuté l'importance, plusieurs circonstances viennent compliquer l'interprétation des expériences qui vont suivre.

a) ETUDE DU COAGULUM.

Une solution d'albumine à 3,0 p. 100 dans un tampon phosphate M/4 (pH = 7,4) est soumise pendant 45 min. à un barbotage assez rapide de cétène (2 bulles/sec.). La température est de 20° et le pH est constamment maintenu à 7,5 par addition de soude. Le coagulum est lavé et dispersé dans la quantité de dodécylsulfate nécessaire aux dosages ultérieurs.

Le dosage pH 11 qui, normalement, devrait indiquer la somme globale tyrosine + tryptophane + cystéine (colorimétriques) s'est révélé nettement trop faible. Nous attribuons ce fait à la présence du détergent qui, on le sait, ralentit considérablement l'hydrolyse des liaisons acylées. Ce détergent ne peut être éliminé par dialyse sous peine de voir la protéine précipiter. Nous avons donc renoncé à toute détermination précise du pourcentage de tyrosine acétylée dans le coagulum. Ce pourcentage peut toutefois être estimé de façon approximative comme suit : pendant le dosage pH 8, la cystéine ne joue aucun rôle puisqu'elle est complètement acétylée. La coloration obtenue est donc uniquement due à la tyrosine et au tryptophane non-acétylés. Si on lui retranche la totalité du tryptophane, on obtient alors une valeur minimum pour la tyrosine non-acétylée. Dans le cas présent, nous

trouvons environ 20 p. 100 de la tyrosine totale (colcrimétrique). Ce résultat, quoique imprécis, montre déjà que les groupes phénol de l'albumine n'acquièrent pas à la dénaturation une « réactivité » égale à celle des groupes de la glycylytyrosine.

b) ACÉTYLATION DES GROUPES PHÉNOL DE L'ALBUMINE
EN DISPERSION DANS LE DODÉCYLSULFATE.

Quand on ajoute un tampon acétate (pH = 5,6) ou phosphate (pH = 7,5) à une dispersion d'albumine dans le dodécylsulfate, la protéine précipite entièrement. Ce fait ne nous a pas gêné dans notre première étude car les SH s'acétylent très bien en milieu acide et l'cn peut opérer sans tampon. Dans le cas présent, l'emploi d'un tampon paraît indispensable. Nous avons alors noté qu'un tampon citrate M/2 à pH = 6,4 pouvait à la rigueur être utilisé, mais l'addition ultérieure de quantités même minimales de soude, destinées à maintenir le pH à sa valeur initiale, provoque la précipitation. Il est donc, en tout cas, impossible d'éviter une acidification progressive du milieu. Cette acidification est évidemment préjudiciable à la bonne marche de l'acétylation et, afin d'obtenir des bases précises de comparaison, nous avons effectué des expériences-témoin, dans les mêmes conditions, sur la glycylytyrosine, l'insuline et l'albumine d'œuf native.

Notons, d'autre part, que, contrairement à ce que l'on observe au paragraphe (a), le détergent peut être ici éliminé par dialyse, une fois l'acétylation terminée, sans que la protéine coagule. Cette circonstance favorable permet d'appliquer la technique de détermination du pourcentage de tyrosine acétylée (Tableau XVI) telle qu'elle est décrite plus haut.

TABLEAU XVI.

Acétylation par le cétène des groupes phénol de l'albumine dénaturée par le dodécylsulfate.

Durée de l'acétylation (min.)	P. 100 de tyrosine acétylée			
	Glycylytyrosine	Albumine native	Albumine dénaturée	Insuline
10	33	0	0	3
20	53	0	0	15
30	64	0	15	20

Les chiffres du Tableau XVI suggèrent les quelques remarques suivantes :

1. Comme nos essais précédents le laissaient prévoir, ces nouvelles expériences montrent clairement que les groupes phénol de l'albumine dénaturée s'acétylent moins bien que ceux de la glycylytyrosine. La dénaturation de l'albumine ne provoque donc pas, chez les groupes phénol, une variation de « réactivité » aussi marquée que chez les groupes thiol.

2. Quant au comportement des groupes de l'albumine dénaturée et de l'insuline, nos expériences sont trop imprécises pour permettre d'affirmer qu'il est identique. L'obligation où nous sommes en effet de travailler à pH variable, ralentit beaucoup les acétylations et rend les différences éventuelles peu sensibles. Il est toutefois probable que l'acétylation des OH phénoliques, comme leur ionisation, progresse de manière analogue dans les deux protéines.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS GÉNÉRALES.

Au cours du présent travail, nous nous sommes attachés à préciser nos connaissances concernant l'action du cétène et de l'isocyanate de phényle sur les protéines. Dans une partie générale, nous évoquons et discutons tout d'abord certains aspects de la structure protéique, ceux qui touchent plus particulièrement à la « réactivité » des groupes latéraux de ces substances et aux variations que subit cette « réactivité » pendant la dénaturation. Puis nous cherchons à savoir si le cétène et l'isocyanate de phényle qui, on le sait, acylent les groupes aminés (lysine) et phénoliques (tyrosine), n'attaquent pas aussi les noyaux imidazol (histidine) et les groupes thiol (cystéine) des protéines. A la lumière des résultats obtenus dans ce dernier domaine, nous cherchons à préciser le caractère « sulfhydryl enzyme » de l'uréase. Enfin, nous entreprenons une étude détaillée de l'action du cétène sur les groupes phénoliques de diverses protéines natives et dénaturées.

Les principales étapes de notre travail et les conclusions générales susceptibles d'en être tirées sont résumées ci-après :

1°) Nous donnons une description précise du dosage des groupes thiol et phénol protéiques. Les éléments des courbes de référence sont fournis sous forme de tableaux.

2°) Nous décrivons les techniques utilisées pour la préparation des diverses substances utilisées au cours de ce travail. Nous nous étendons spécialement sur l'obtention de l'uréase selon Sumner et Hellerman. Nous donnons les caractéristiques biologiques et chimiques de nos préparations.

3°) Nous montrons que le cétène détruit lentement le noyau imidazol de l'histidine en donnant naissance à un dérivé instable dont la dégradation ultérieure conduit entre autres, à de l'ammoniaque. La réaction entre les glyoxalines substituées et le cétène n'est pas du type « Bamberger ».

4°) Nous observons par contre que les noyaux imidazol des « restes » histidine de la gélatine, de l'albumine d'œuf cristallisée et de la sérumalbumine ne sont pas touchés par le cétène. Plusieurs hypothèses peuvent être formulées à cet égard dont les plus vraisemblables sont discutées.

5°) Nous étudions en très grand détail l'acylation au cétène et à l'isocyanate de phényle, des groupes SH de l'albumine d'œuf native ou dénaturée et de la kératine. Les groupes « non-réactifs » de l'al-

bumine native sont lentement acylés en milieu neutre ou alcalin. En milieu acide, il n'y a pas acylation. Par contre, si ces mêmes groupes sont devenus « réactifs » par dénaturation (coagulation de la protéine ou dispersion dans le dodécylsulfate de Na), l'acylation se produit presque instantanément dans un large intervalle de pH. Le fait que les SH « réactifs » s'acylent en milieu acide nous paraît intéressant car, en ce même milieu, les NH_2 et OH phénoliques ne sont pas touchés.

Les groupes thiol de la kératine, « réactifs » avant toute dénaturation, s'acylent également très vite.

6°) Nous avons cherché à connaître le nombre de mol. de cétène et d'isocyanate nécessaires au blocage de un groupe SH « réactif ». Pour ce faire, nous avons préparé des solutions titrées de cétène dans l'éther et d'isocyanate dans l'acétone et nous décrivons une méthode permettant de connaître le titre de ces solutions.

Pour acyler un SH « réactif » de l'albumine d'œuf dans le dodécylsulfate de Na, il suffit de 1,16 mcl. d'isocyanate de phényle. Cette dernière substance possède donc pour les SH « réactifs » une affinité beaucoup plus grande que pour l'eau. Par contre, il faut plus de 30 mol. de cétène pour acétyler, dans les conditions optimum, un SH « réactif » de la même protéine. Si donc on tient à placer l'acylation des groupes thiol protéiques sur le plan stoechiométrique, l'isocyanate de phényle est préférable au cétène.

7°) Nous avons préparé des solutions d'uréase hautement purifiées (pureté : 35.000 U.g.) à partir de *Canavalia Ensiformis*. Ces préparations contiennent encore quelques protéines étrangères mais leur teneur en SH « réactifs » correspond exactement à leur activité uréolytique (si l'on admet que 1 g. d'uréase possède une activité de 130.000 U. et que 21.300 g. d'uréase renferment un SH « réactif »). Nous avons donc pu utiliser ces préparations dans nos recherches ultérieures.

8) Nous nous sommes alors proposés d'acyler l'uréase avec des quantités croissantes et connues d'isocyanate de phényle. Nous avons mesuré après chaque traitement la teneur en SH des échantillons et leur activité enzymatique. Nous pensons que l'étude correcte d'un phénomène d'inhibition enzymatique devrait toujours porter, non seulement, comme on le fait couramment, sur la baisse d'activité en fonction de la quantité d'inhibiteur en jeu mais aussi sur la comparaison entre la baisse d'activité et les *modifications chimiques* que provoque cet inhibiteur dans les *molécules enzymatiques*.

9°) Les SH les plus « réactifs » de l'uréase (SH(a) de Hellerman) peuvent être acylés sans que l'activité de l'enzyme s'en ressente. Nous confirmons donc pleinement à cet égard les vues de Hellerman : l'activité uréolytique n'est pas sous la dépendance des SH « réactifs » bien que ce soient ces derniers qui aient, dès l'abord, fait classer l'uréase dans le groupe des « sulfhydryl enzymes ».

10°) Après les SH (a), d'autres SH beaucoup moins « réactifs » commencent à s'acyler. On assiste en même temps à une baisse très rapide de l'activité enzymatique. Cette inactivation semble totale

avant que les SH (b) de Hellerman soient complètement bloqués. L'opportunité d'attribuer l'inactivation, non à l'acylation de certains SH (b) précis, mais à l'acylation commençante des SH « non-réactifs » pris dans leur ensemble, est alors discutée.

11°) Une théorie, que nous n'avons pas encore eu l'occasion d'ailleurs de vérifier sur d'autres exemples, est alors présentée. Elle suggère, quand l'activité physiologique d'une protéine semble dépendre du blocage de l'un de ses groupes « non-réactifs », que l'inactivation résulte, non du blocage lui-même, mais des changements structuraux plus ou moins réversibles survenant au niveau de ces groupes, au moment où on les force à réagir.

12°) La vitesse de l'acylation au cétène des groupes phénol appartenant à la glycylytyrosine, à l'albumine d'œuf *native* et à l'insuline est ensuite comparée (pH = 5,6 et pH = 7,5). Elle décroît dans l'ordre suivant : Glycylytyrosine > Insuline > Albumine *native*. Ces résultats confirment que les atomes d'hydrogène portés par les groupes phénol de l'albumine *native* sont doués d'une très faible mobilité, qui fait également obstacle à leur ionisation (Crammer et Neuberger).

13°) L'acétylation des groupes phénol semble progresser à une vitesse analogue dans l'albumine *dénaturée* et dans l'insuline. La dénaturation, en tous cas, ne fait pas varier la « réactivité » des groupes phénol de l'albumine aussi spectaculairement que celle des groupes thiol. Ce fait suggère que les groupes phénol, contrairement aux groupes thiol, ne jouissent pas de leur pleine « réactivité », même lorsque la dénaturation les a libérés des liaisons structurales dans lesquelles ils sont probablement impliqués au sein des protéines natives.

BIBLIOGRAPHIE.

1. R. M. Herriott. — *Advances in Protein Chemistry*. Vol. IV, 1946.
2. A. Neuberger. — *Biochem. Journ.*, 1938, 32, 1452.
3. H. Fraenkel-Conrat. — *Journ. biol. Chem.*, 1944, 152, 385.
4. L. Hellerman, F. P. Chinard et V. R. Deitz. — *Journ. biol. Chem.*, 1943, 147, 443.
5. R. M. Herriott et J. H. Northrop. — *Journ. gen. Physiol.*, 1935, 18, 35.
6. R. M. Herriott. — *Journ. gen. Physiol.*, 1933, 19, 283.
7. Staudinger Die Ketene. — Stuttgart, 1912.
8. G. L. Miller et W. M. Stanley. — *Science*. 1941, 93, 428.
9. G. Schramm et H. Müller. — *Ztschrft. Physiol. Chem.*, 1942, 274, 267.
10. A. M. Pappenheimer. — *Journ. biol. Chem.*, 1938, 125, 201.
11. G. Schramm et H. Müller. — *Ztschrft. physiol. Chem.*, 1940, 266, 42.
12. A. Kleckowski. — *Brit. J. Exptl. Path.*, 1940, 21, 1.
13. S. J. Hopkins et A. Wormall. — *Biochem. Journ.*, 1933, 27, 740.
14. A. H. Tracy et W. F. Ross. — *Journ. biol. Chem.*, 1942, 142, 871.
15. M. Bergmann et F. Stern. — *Ber. deutsch. Chem. Gesell.*, 1930, 63, 437.
16. E. Bamberger et B. Berbé. — *Liebigs Ann. Chem.*, 1893, 273, 352.
17. A. Windaus, W. Dorries et H. Jensen. — *Ber. deutsch. Chem. Gesell.*, 1921, 54, 2745.
18. K. G. Stern et A. White. — *Journ. biol. Chem.*, 1937, 122, 371.
19. S. J. Hopkins et A. Wormall. — *Biochem. Journ.*, 1934, 28, 2125.
20. H. Jensen et A. E. Evans. — *Journ. biol. Chem.*, 1935, 108, 1.
21. W. E. Gaunt et A. Wormall. — *Biochem. Journ.*, 1936, 30, 1915.
22. K. Freudenberg, W. Dirscherl et H. Eyer. — *Ztschrft. physiol. Chem.*, 1931, 202, 128.
23. F. G. Hopkins. — *Nature*, 1930, 126, 328 et 383.
24. J. P. Greenstein et J. F. Edsall. — *Journ. biol. Chem.*, 1940, 133, 397.
25. D. R. Goddard et L. Michaelis. — *Journ. biol. Chem.*, 1934, 106, 605.
26. H. Neurath, J. P. Greenstein, F. M. Putnam et J. O. Erickson. — *Chem. Rev.*, 1944, 34, 157.
27. A. E. Mirsky et L. Pauling. — *Proc. Natl. Acad. Sci.*, (U. S.), 1936, 22, 439.
28. A. E. Mirsky. — *Journ. gen. Physiol.*, 1941, 24, 709 et 725.
29. J. L. Crammer et A. Neuberger. — *Biochem. Journ.*, 1943, 37, 302.
30. H. Neurath. — *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 1938, 6, 196.
31. K. Linderström-Lang et C. F. Jacobsen. — *Compt. rend. trav. lab. Carlsberg*, 1940, 23, 289.
32. M. P. Schubert. — *Journ. biol. Chem.*, 1936, 114, 341.
33. M. L. Anson. — *Journ. gen. Physiol.*, 1941, 24, 399.
34. D. Jordan-Lloyd et A. Shore in « *Chemistry of the proteins* », 2^e édition, Londres, 1938.
35. G. L. Miller. — *Journ. biol. Chem.*, 1942, 146, 339.

36. A. E. Mirsky et M. L. Anson. — *Journ. gen. Physiol.*, 1936, 19, 451.
 37. R. M. Herriott. — *Journ. gen. physiol.*, 1938, 21, 501.
 38. E. Brand et B. Kassel. — *Journ. biol. Chem.*, 1940, 133, 437.
 39. R. K. Cannan, A. Kibrick et A. H. Palmer. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1941, 41, 241.
 40. J. B. Sumner. — *Journ. biol. Chem.*, 1926, 69, 435 et 70, 97.
 41. J. B. Sumner et L. O. Poland. — *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1933, 30, 553.
 43. L. Hellerman. — *Cold. Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 1939, 7, 165.
 42. L. Hellerman, M. E. Perkins et W. H. Clark. — *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 855, 19, 1933.
 44. C. V. Smythe. — *Journ. biol. Chem.*, 1936, 114, 601.
 45. A. J. P. Martin et R. L. M. Synge. — *Advances in Proteins Chemistry*, vol. II, 1945.
 46. R. Consden, A. H. Gordon et A. J. P. Martin. — *Biochem. Journ.*, 1946, 40, 33.
 47. R. Kuhn et P. Desnuelle. — *Ber. deutsch. Chem. Gesell.*, 1937, 70, 1907.
 48. A. E. Mirsky et M. L. Anson. — *Journ. gen. Physiol.*, 1935, 18, 307.
 49. R. Kuhn et P. Desnuelle. — *Ztschrft. physiol. Chem.*, 1938, 251, 14.
 50. J. P. Greenstein. — *Journ. biol. Chem.*, 1938, 125, 501.
 51. M. L. Anson. — *Advances in Proteins Chemistry*, Vol. II, 1945.
 52. L. Hellerman, F. P. Chinard et P. A. Ramsdell. — *Journ. Am. Chem. Soc.*, 1941, 63, 2551.
 53. M. L. Anson. — *Journ. gen. Physiol.*, 1942, 25, 355.
 54. K. Bailey et S. V. Perry. — *Biochem. et Biophysic. Acta.*, 1947, 1, 506.
 55. M. L. Anson. — *Journ. gen. Physiol.*, 1939, 23, 247.
 56. O. Folin et V. Ciocalteu. — *Journ. Biol. Chem.*, 1927, 73, 627.
 57. G. L. Miller. — *Journ. biol. Chem.*, 1942, 146, 345.
 58. Allport. — *Colorimetric Analysis*, Londres, 1945.
 59. P. Fischer. — *Bull. Soc. Roy. Sciences*, (Liège), 1943, 4, 235.
 60. A. L. Dounce. — *Journ. biol. Chem.*, 1941, 140, 307.
 61. D. R. Goddard et L. Michaelis. — *Journ. biol. Chem.*, 1934, 106, 605.
 62. G. Desseigne. — *Corps Gras*, 1945, 1, 136.
 63. E. Jorpes. — *Biochem. Journ.*, 1932, 2, 1507.
 64. G. R. Tristram. — *Biochem. Journ.*, 1939, 33, 1271.
 65. L. Hellerman. — *Physiol. Revs.*, 1937, 17, 454.
-

TABLE DES MATIÈRES.

INTRODUCTION	7
CHAPITRE I. — <i>Exposé bibliographique</i>	11
<i>Paragraphe I</i> : Acylation des protéines	11
A. — Acylation des —NH_2 et des OH phénoliques.....	11
B. — Autres transformations	15
<i>Paragraphe II</i> : « Réactivité » des groupes thiol et phénol dans les protéines natives et dénaturées	17
A. — « Réactivité » des groupes thiol protéiques	18
B. — « Réactivité » des groupes phénol protéiques....	19
<i>Paragraphe III</i> : Rôle des groupes thiol dans l'activité de l'uréase	22
CHAPITRE II. — <i>Techniques utilisées</i>	24
<i>Paragraphe I</i> : Séparation des amino-acides par ionophorèse	24
<i>Paragraphe II</i> : Diverses techniques colorimétriques	26
A. — Histidine	26
B. — Groupes thiol protéiques	26
C. — Groupes phénol protéiques	29
<i>Paragraphe III</i> : Diverses préparations	33
1° Préparation de l'uréase	33
2° Préparation de l'albumine d'œuf cristallisée	36
3° Préparation de la kératine	36
4° Préparation du dodécylsulfate de Na	37
5° Préparation du cétène	37
<i>Paragraphe IV</i> : Mise en œuvre des acylations	38
1° Acylations simples en présence de tampon	38
2° Acylations en présence de dodécylsulfate	38
3° Acylations stoechiométriques	39
CHAPITRE III. — <i>Sort de l'histidine au cours de l'acétylation des protéines par le cétène</i>	40
CHAPITRE IV. — <i>Acylation des groupes —SH protéiques et son application à l'étude de l'uréase</i>	44
<i>Paragraphe I</i> : Etude de l'acylation des groupes thiol de l'albumine et de la kératine	44
A. Hydrolyse alcaline des liaisons S-acylées	44
B. Acylation de l'albumine native :.....	45

C. Acylation de l'albumine dénaturée	47
1°) par un excès indéterminé d'agent acylant	47
2°) par des quantités connues d'agent acylant	48
D. Acylation de la kératine	50
<i>Paragraphe II : Inactivation de l'uréase par l'isocyanaté de phényle</i>	51
A. Généralités	51
B. Caractéristiques des préparations d'uréase utilisée..	51
C. Influence de l'acylation sur l'activité de l'uréase	51
CHAPITRE V. — <i>Sur l'acétylation des groupes phénol protéiques.</i>	56
<i>Paragraphe I : Eléments d'appréciation déjà connus</i>	57
<i>Paragraphe II : Comparaison à divers pH de la vitesse d'acétylation des OH phénoliques appartenant à la glycytyrosine, à l'albumine d'œuf et à l'insuline</i>	58
<i>Paragraphe III : Essai de comparaison entre l'acylation des OH phénoliques de l'albumine d'œuf native et dénaturée.</i>	60
A. Etude du coagulum	60
B. Acétylation des OH phénoliques de l'albumine en dispersion dans le dodécylsulfate	61
RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS GÉNÉRALES	63
BIBLIOGRAPHIE	67



M. DECLUME, Imprimeur, Lons-le-Saunier (31.2160). — 1271-49-200:
Octobre 1949 « Dépôt légal 4^e trimestre 1949, n° 3818 »;

